

Synthese molekularer Bildgebungs- sonden für die molekulare Magnetresonanztomographie

Funktionalisierung von superparamagnetischen Eisenoxidnanopartikeln

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Chemie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

vorgelegt von

Dipl.-Chem. Lena Figge geb. Schönzart

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin:

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät:

Prof. Dr. Elmar Kulke

Gutachter: 1. Prof. Dr. Oliver Seitz
 2. Prof. Dr. Eyk Schellenberger

Tag der mündlichen Prüfung: 23.06.2014

Die vorliegende Arbeit wurde im Arbeitskreis von Prof. Dr. Eyk Schellenberger am Institut für Radiologie in der Abteilung Experimentelle Radiologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin und unter der Betreuung von Prof. Dr. Oliver Seitz am Institut für Chemie im Fachinstitut für Organische und Bioorganische Chemie der Humboldt-Universität zu Berlin von April 2009 bis Februar 2014 angefertigt.

DANKSAGUNG

Danken möchte ich insbesondere Prof. Dr. Oliver Seitz für die konstruktive Betreuung meiner Arbeit und für viele Denkanstöße in die richtige Richtung.

Ein großer Dank geht an Prof. Dr. Eyk Schellenberger für die intensive Betreuung, stete Unterstützung und Diskussionsbereitschaft sowie sein Vertrauen in mich.

Der gesamten Arbeitsgruppe Schellenberger danke ich für die angenehme und vertrauensvolle Zusammenarbeit. Besonders zu nennen sind an dieser Stelle Franziska Appler für die Durchführung der Tierversuche und Gesche Genter für die tatkräftige Unterstützung bei zahlreichen Experimenten. Dr. Akvile Häckel danke ich für viele aufmunternde Worte. Constantin Scharlach danke ich nicht zuletzt für die ein oder andere Runde Trivial Pursuit.

Bei Dr. Jörg Schnorr sowie der gesamten Experimentellen Radiologie möchte ich mich herzlich für die gute Zusammenarbeit und die nette Stimmung bedanken. Dr. Harald Kratz danke ich außerdem für die vielen guten Ratschläge und die Durchsicht meiner Arbeit. Monika Ebert danke ich für die Synthese der VSOP.

Weiterer Dank geht an Prof. David Sosnovik und Dr. Howard Chen von der Harvard Medical School in Boston, Massachusetts, für die Testung der Apoptosesonde im Tiermodell. Dr. Rudolf Volkmer und seiner Arbeitsgruppe vom Institut für Medizinische Immunologie der Charité danke ich für die Möglichkeit, die MALDI/TOF-MS-Messungen durchzuführen, und für die freundliche Einweisung in die Geräte. Der gesamten Arbeitsgruppe Seitz danke ich für zahlreiche Hilfestellungen.

Meinen Eltern, meiner Familie und meinen Freunden danke ich herzlichst dafür, dass sie mich immer unterstützt und an mich geglaubt haben.

Ganz besonderer Dank gilt Asmus für seine grenzenlose Unterstützung. Er wusste stets aufs Neue, mich zu ermutigen und zu motivieren. Lotta danke ich für jedes kleine und große Lächeln.

ABSTRACT

The goal of molecular imaging is to characterize and measure biological processes at cellular and molecular levels for the purpose of diagnosing the cause of diseases and molecular abnormalities. Molecular imaging is based on the use of probes with a high affinity to the target tissue and / or which are specifically activated. The aim of this study was to develop and analyze new molecular imaging probes for the *in vivo* imaging of apoptosis and enzyme activity using magnetic resonance imaging (MRI), based on very small iron oxide particles (VSOP). VSOP are superparamagnetic and electrostatically stabilized due to their negatively charged citrate surface. For the imaging of apoptosis the protein annexin A5 (AnxA5) was coupled to the citrate surface (AnxA5-VSOP). For the imaging of enzyme activities an activatable imaging probe with a cleavage site for the matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) was synthesized (protease-specific iron oxide particles, PSOP).

A simplified method for the synthesis of AnxA5-coated VSOP was established. After activation of the citrate surface with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) and *N*-hydroxysulfosuccinimide (Sulfo-NHS), the particles became reactive towards primary amino groups and AnxA5 was covalently coupled via amide bonds. The AnxA5-VSOP were highly covered with protein and stable at physiological conditions. The relaxation times and relaxivities were constant in blood as well as in fetal calf serum (FCS). The binding site of AnxA5 was still active and *in vitro* characterization showed specific binding of AnxA5-VSOP to apoptotic cells, which led to the desired contrast effect in T2*-weighted measurements, while the non-binding control probe produced no such effect, indicating low unspecific binding. Exploratory *in vivo* measurements in a mouse model of cardiac ischemia-reperfusion damage showed AnxA5-VSOP uptake in the injured myocardium, thereby indicating the successful realization of the desired properties and illustrating their potential use in future studies. The hydrodynamic diameter of only 14 nm makes the AnxA5-VSOP the smallest iron-oxide based probes for MR imaging of apoptosis while having a high relaxivity.

The function of protease-specific iron oxide particles (PSOP) is based on the enzymatic activation by a matrix metalloproteinase. The electrostatically stabilized VSOP were coated with peptide-PEG-conjugates (PEG: polyethylene glycol) and the particles became sterically stabilized due to the PEG shell. The PEGylated peptides were polycationic in nature and pos-

sessed a cleavage site for MMP-9. As a result of specific enzymatic cleavage the PSOP lose their sterically stabilizing PEG-shell. This consequently exposes a mixture of charges on their surface, which leads to their aggregation. The PSOP were synthesized by coupling several types of peptide-PEG-conjugates varying in their amino acid sequence (arginine-rich vs. lysine-rich) and their number of PEG binding sites. The influence of these parameters (namely amino acid sequence and PEG binding sites) on the physicochemical stability was analyzed in the presence of NaCl and several salts at near-physiological concentrations. Electrostatic coating of VSOP with peptide-PEG-conjugates produced PSOP, that although activated *in vitro* were unstable in NaCl containing solutions. Moreover a higher amount of PEG chains could not improve the stability. On the other hand, covalent coupling of lysine-rich peptide-PEG-conjugates lead to PSOP with a very high stability. The enzymatic activation however, was very limited. In addition to varying peptide-PEG-conjugates, the PSOP synthesis was altered by manipulating the ratio of conjugate per VSOP. However, the present study demonstrates that at tested conditions the PSOP may either be stable or activated, but not both simultaneously. Therefore future studies ought to investigate parameters, such as iron oxide particles with a different shell, to produce PSOP that are stable at physiological conditions and still enzymatically activated.

ZUSAMMENFASSUNG

Zweck der molekularen Bildgebung ist es, biologische Prozesse auf zellulärer und molekularer Ebene zu messen und zu charakterisieren, um so die Ursachen von Krankheiten und Veränderungen im Organismus zu diagnostizieren. Sie basiert auf dem Einsatz molekularer Bildgebungssonden, welche einen spezifischen biologischen Vorgang darstellen oder sich spezifisch in dem zu untersuchenden Gewebe anreichern oder aktiviert werden. Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Analyse neuer Bildgebungssonden für die spezifische *in-vivo*-Bildgebung der Apoptose und von Enzymaktivitäten mittels Magnetresonanztomographie (MRT) auf der Grundlage sehr kleiner Eisenoxidnanopartikel (*very small iron oxide particles*, VSOP). VSOP sind superparamagnetisch und durch ihre negativ geladene Citrathülle elektrostatisch stabilisiert. Für die Apoptose-Bildgebung sollte durch Bindung des Proteins Annexin A5 (AnxA5) an die Citrathülle der VSOP eine zielgerichtete Sonde hergestellt werden (AnxA5-VSOP). Für die Bildgebung von Enzymaktivitäten sollte eine durch die Matrixmetalloproteinase-9 (MMP-9) aktivierbare Sonde hergestellt werden (Protease-spezifische Eisenoxidpartikel, PSOP).

Durch die kovalente Bindung von AnxA5 an die Citrathülle der VSOP konnte erfolgreich eine vereinfachte Synthese von AnxA5-beschichteten VSOP etabliert werden. Nach Aktivierung der Citrathülle mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und *N*-Hydroxysulfosuccinimid (Sulfo-NHS), erfolgte die Anbindung des Proteins über die Aminogruppen der Lysine unter Ausbildung von Amidbindungen. Die AnxA5-VSOP zeichneten sich durch eine hohe Proteinabdeckung und eine gute Stabilität unter physiologischen Bedingungen aus. Die Partikel hatten sowohl in Blut als auch in fötalem Kälberserum (FCS) konstante Relaxationszeiten und Relaxivitäten. Die Bindungseigenschaften von AnxA5 blieben erhalten und die Inkubation apoptotischer Zellen mit AnxA5-VSOP führte zu dem gewünschten Kontrasteffekt in der T2*-gewichteten MRT-Messung, während die nicht-bindende Kontrollsonde nur sehr geringe unspezifische Wechselwirkungen einging. Erste *in-vivo*-Untersuchungen in einem Ischämie-Reperfusion-Modell, bei denen eine AnxA5-VSOP-Anreicherung im apoptotischen Gewebe zu beobachten war, deuten ebenfalls auf eine erfolgreiche Realisierung der gewünschten Eigenschaften hin. AnxA5-VSOP stellen bei besseren magnetischen Eigenschaften mit einem hydrodynamischen Durchmesser von nur 14 nm die kleinsten Apoptosesonden

basierend auf Eisenoxidpartikeln für die MRT dar. AnxA5-VSOP können zukünftig in weiterführenden Modellen auf ihre *in-vivo*-Anwendbarkeit untersucht werden.

Die Funktion der protease-spezifischen Eisenoxidpartikeln (PSOP) basierte auf der enzymatischen Aktivierung durch eine Matrixmetalloproteinase. Die ursprünglich elektrostatisch stabilisierten VSOP wurden mit Peptid-PEG-Konjugaten beschichtet, welche den Partikeln aufgrund der PEG-Hülle eine sterische Stabilisierung verliehen. Das PEGylierte Peptid wies lokal einen stark polykationischen Charakter auf und verfügte zudem über eine Schnittstelle für das Enzym MMP-9. Infolge der enzymatischen Aktivierung wurden die Peptid-PEG-Reste abgespalten, wodurch die PSOP ihre sterische Stabilisierung verloren. Zudem wurde eine gemischt geladene Oberfläche freigelegt, was in einer Aggregation der Partikel resultierte. Die Synthese der PSOP erfolgte durch Kopplung verschiedener Peptid-PEG-Konjugate, welche sich in ihrer Aminosäuresequenz (argininreich vs. lysinreich) und in der Anzahl der PEG-Kopplungsstellen für einen Vergleich dieser PSOP hinsichtlich der Stabilität unter physiologischen Bedingungen unterschieden. Die elektrostatische Beschichtung der VSOP mit den Peptid-PEG-Konjugaten erzielte PSOP, welche *in vitro* enzymatisch aktivierbar waren. Diese wiesen jedoch eine geringe Stabilität in NaCl-haltigen Lösungen auf, welche auch durch eine dichtere PEG-Hülle nicht verbessert wurde. Durch die kovalente Kopplung der lysinreichen Konjugate wurde hingegen eine hohe Salzstabilität erreicht, die enzymatische Aktivierbarkeit wurde allerdings stark eingeschränkt. Neben dem Einsatz verschiedener Konjugate wurde auch die Synthese der PSOP angepasst und unterschiedliche Verhältnisse an Konjugat zu VSOP getestet. Es ließen sich auf Basis der VSOP jedoch *entweder* Partikel mit einer verlässlich stabilen Beschichtung *oder* enzymatisch aktivierbare Partikel herstellen. In zukünftigen Arbeiten sollten daher z. B. Eisenoxidpartikel mit einer anderen Hülle getestet werden, um so PSOP herzustellen, welche möglicherweise die gewünschten Eigenschaften, insbesondere hohe Stabilität und enzymatische Aktivierbarkeit, aufweisen.

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung.....	1
2. Stand der Forschung.....	3
2.1. Biologischer und medizinischer Hintergrund.....	3
2.1.1. Apoptose und Annexin A5.....	3
2.1.2. Extrazelluläre Matrix und Matrixmetalloproteinasen.....	6
2.2. Molekulare Bildgebung.....	9
2.2.1. Übersicht verschiedener bildgebender Verfahren und molekularer Bildgebungssonden.....	9
2.2.2. Grundlagen der Magnetresonanztomographie und die Wirkung von MRT- Kontrastmitteln.....	14
2.3. Konjugatsynthese.....	17
2.3.1. Synthese von Biokonjugaten.....	17
2.3.2. Funktionalisierung von Eisenoxidnanopartikeln mit Biomolekülen.....	21
3. Zielstellung.....	25
4. Ergebnisse und Diskussion.....	29
4.1. AnxA5-beschichtete VSOP.....	29
4.1.1. AnxA5-Peptid-VSOP.....	31
4.1.1.1. Synthese der AnxA5-Peptid-AnxA5-Konjugate.....	31
4.1.1.2. Elektrostatische Beschichtung von VSOP mit AnxA5-Peptid-AnxA5- Konjugaten.....	39
4.1.2. AnxA5-VSOP.....	40
4.1.2.1. Kovalente Bindung von AnxA5 an VSOP-Oberfläche.....	40
4.1.2.2. Stabilitätsuntersuchungen der AnxA5-VSOP.....	44
4.1.2.3. In-vitro-Untersuchung der spezifischen Bindung von AnxA5-VSOP an apoptotische Zellen.....	49
4.1.2.4. In-vivo-Untersuchung der Signalintensität halbwertszeit von AnxA5-VSOP im Blut und der spezifischen Bindung von AnxA5-VSOP an apoptotische Zellen.....	52

4.1.3. Diskussion.....	55
4.1.3.1. AnxA5-Peptid-VSOP	55
4.1.3.2. AnxA5-VSOP.....	58
4.2. Protease-spezifische Eisenoxidnanopartikel (PSOP)	66
4.2.1. Synthese und Charakterisierung der Peptid-PEG-Konjugate	69
4.2.1.1. NHS-Kopplung	69
4.2.1.2. Maleimid-Kopplung	75
4.2.2. Synthese und Charakterisierung der PSOP.....	79
4.2.2.1. Untersuchung des optimalen Verhältnisses aus Konjugat zu VSOP	80
4.2.2.2. Untersuchung der Stabilität und enzymatischen Aktivierbarkeit elektrostatisch beschichteter PSOP mit argininreichen Konjugaten	83
4.2.2.3. Untersuchung der Stabilität und enzymatischen Aktivierbarkeit kovalent beschichteter PSOP mit lysinreichen Konjugaten.....	87
4.2.3. Diskussion.....	98
4.2.3.1. Synthese der Peptid-PEG-Konjugate	98
4.2.3.2. Synthese und Charakterisierung der PSOP.....	98
5. Zusammenfassung und Ausblick	109
5.1. AnxA5-beschichtete VSOP.....	109
5.2. PSOP.....	111
6. Experimenteller Teil	115
6.1. Chemikalien	115
6.2. VSOP.....	117
6.3. Biologisches Material	118
6.4. Geräte und Hilfsmittel.....	118
6.4.1. Konzentrierung und Filtration über Zentrifugen-Filtrationseinheiten	118
6.4.2. Größenausschlusschromatographie	119
6.4.3. HPLC.....	120
6.4.4. MALDI/TOF-Massenspektrometrie	121
6.4.5. PAGE.....	121
6.4.5.1. SDS-PAGE.....	122
6.4.5.2. Native PAGE	123
6.4.6. UV/Vis-Spektroskopie	123
6.4.7. Fluoreszenzspektroskopie	124
6.4.8. Dynamische Lichtstreuung	124
6.4.9. Durchflusszytometrie	125
6.4.10. Relaxivitätsmessungen	125
6.4.11. Magnetresonanztomographie	125

6.5. Synthese und Charakterisierung von AnxA5-beschichteten VSOP	126
6.5.1. AnxA5-Peptid-VSOP	127
6.5.1.1. Synthese des AnxA5-Peptid-AnxA5-Konjugats mittels SPDP	127
6.5.1.2. Synthese des AnxA5-Peptid-AnxA5-Konjugats mittels Sulfo-SMCC	127
6.5.1.3. Elektrostatische Beschichtung von VSOP mit AnxA5-Peptid-Konjugaten	128
6.5.2. AnxA5-VSOP	129
6.5.2.1. Kovalente Bindung von AnxA5 an VSOP-Oberfläche	129
6.5.2.2. Kovalente Bindung von M1234 an VSOP-Oberfläche	129
6.5.2.3. Stabilitätsuntersuchung der AnxA5-VSOP	130
6.5.2.4. In-vitro-Untersuchung der spezifischen Bindung von AnxA5-VSOP an apoptotische Zellen	130
6.5.2.5. In-vivo-Untersuchung der Signalintensität halbwertszeit von AnxA5-VSOP im Blut und der spezifischen Bindung von AnxA5-VSOP an apoptotische Zellen	131
6.6. Synthese und Charakterisierung von PSOP	132
6.6.1. Synthese der Peptid-PEG-Konjugate	132
6.6.1.1. NHS-Kopplung	132
6.6.1.2. Maleimid-Kopplung	133
6.6.2. Elektrostatische Beschichtung der VSOP mit Peptid-PEG-Konjugaten	134
6.6.3. Kovalente Beschichtung der VSOP mit Peptid-PEG-Konjugaten	134
6.6.3.1. Vorschrift zur kovalenten Anbindung von 10 bzw. 20 lysinreichen Peptid- PEG-Konjugaten an die Citratgruppen der VSOP	135
6.6.3.2. Vorschrift zur kovalenten Anbindung von 5 lysinreichen Peptid-PEG- Konjugaten an die Citratgruppen der VSOP	135
6.6.4. Untersuchung des optimalen Verhältnisses aus Konjugat zu VSOP	136
6.6.5. Untersuchung des PSOP-Verhaltens unter Einfluss von NaCl	136
6.6.6. Untersuchung der enzymatischen Aktivierbarkeit der PSOP	136
6.6.7. Untersuchung möglicher Nebenreaktionen der Konjugate mit EDC und Sulfo- NHS sowie der enzymatischen Hemmung durch Sulfo-NHS	137
Literaturverzeichnis	139
Abkürzungsverzeichnis	153
Anhang	157
Publikationsliste	165

1. EINLEITUNG

Die frühe Diagnose von Krankheiten spielt eine wichtige Rolle für eine erfolgreiche Therapie. Ferner ist eine präzise Überwachung der Therapie von großer Bedeutung, damit diese frühzeitig angepasst oder geändert werden kann. Ziel der molekularen Bildgebung ist es, biologische Prozesse auf zellulärer und molekularer Ebene zu messen und zu charakterisieren [1]. Dadurch soll eine wesentlich frühere Beurteilung von Krankheiten und Veränderungen im Organismus möglich werden, als es mit der klassischen Bildgebung der Fall ist [1]. Die molekulare Bildgebung basiert dabei auf dem Einsatz molekularer Bildgebungssonden, welche sich spezifisch in dem zu untersuchenden Gewebe oder Organ anreichern oder aktiviert werden. Molekulare Bildgebungssonden helfen somit dabei, die Geschehnisse zu verstehen und zu lokalisieren [1]. Zahlreiche bildgebende Verfahren, wie die Magnetresonanztomographie (MRT), Positronenemissionstomographie (PET) und Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (*Single-photon emission computed tomography*, SPECT) sowie die Fluoreszenztomographie und die Optoakustik kommen in der molekularen Bildgebung zum Einsatz [2-4]. Die MRT vereint indes eine Vielzahl von Vorteilen, z. B. einen hohen Weichteilkontrast und eine hohe Auflösung, während sie keinerlei radioaktive Belastung für den Patienten darstellt [2, 5].

Von großer Bedeutung ist die Bildgebung von Apoptose. Die Apoptose, sprich der programmierte Selbstmord der Zellen, ist in zahlreichen Krankheiten dereguliert [6-9]. In degenerativen Krankheiten, Atherosklerose oder bei Schlaganfallpatienten konnte eine erhöhte Apoptoserate nachgewiesen werden, während bei Krebs Zellwucherungen auftreten und die Apoptoserate zu gering ist [10]. Die Apoptose-Bildgebung kann daher nicht nur zur Beurtei-

lung des Verlaufs der Krankheit genutzt werden, sondern bspw. bei Tumorbehandlungen auch zur Bewertung des Therapieerfolges [11]. Ein weiterer Ansatzpunkt ist die Darstellung und Lokalisation von Enzymaktivitäten [12, 13]. Die Enzymklasse der Matrixmetalloproteinasen (MMP) gehört zu wichtigen Regulatoren und Effektoren von physiologischen und pathologischen Gewebeveränderungen [14]. Sie spielen eine große Rolle im Auf- und Abbau der extrazellulären Matrix und stellen somit geeignete Zielmoleküle für die Untersuchung von Krebs, Atherosklerose, Multipler Sklerose oder Arthritis dar [14-16].

Die Entwicklung neuer und spezifischer Bildgebungssonden für die molekulare MRT stellt daher ein lohnendes Aufgabengebiet dar. Durch Funktionalisierung von ursprünglich unspezifischen Eisenoxidnanopartikeln, z. B. der *very small iron oxide particles* (VSOP), mit Proteinen, Peptiden oder Nukleinsäuren, lassen sich zielgerichtete oder aktivierbare Bildgebungssonden herstellen [13, 17]. Ein häufig genutztes Protein ist z. B. Annexin A5, welches an apoptotische Zellen bindet [18-20]. Mit Hilfe geeigneter Erkennungssequenzen in Peptiden lassen sich ferner die Enzymaktivitäten von MMP abbilden [12, 21]. In der vorliegenden Arbeit wird die Synthese von AnnexinA5-beschichteten VSOP sowie von MMP-aktivierbaren VSOP vorgestellt.

2. STAND DER FORSCHUNG

2.1. Biologischer und medizinischer Hintergrund

2.1.1. Apoptose und Annexin A5

Unter Apoptose versteht man den programmierten Zelltod, um Zellen sicher zu entfernen. Im Gegensatz zu anderen Todesarten der Zelle, z. B. der Nekrose, ist die Apoptose ein gut regulierter Prozess und ist essentiell für die normale Entwicklung des Gewebes sowie die Aufrechterhaltung der Homöostase [22, 23]. Lediglich bei gleicher Rate der Apoptose und der Zellteilung (Mitose) bleibt die Anzahl der Zellen eines Organs konstant. Neben der Apoptose gibt es noch weitere Prozesse (Pyroptose, Entose, Nekroptose) für den regulierten Abbau von Zellen, die sich jedoch in den Abläufen von der Apoptose unterscheiden [23].

Die Apoptose kann entweder durch extrazelluläre (extrinsisch) oder durch intrazelluläre Signale (intrinsisch) initiiert werden (Abbildung 2.1) [24, 25]. Beim extrinsischen Weg bindet z. B. der Tumornekrosefaktor (TNF) an die sogenannten Todesrezeptoren auf der Membran [26]. Dies führt zur Aktivierung der Caspase-8, welche wiederum Caspase-3 aktiviert. Caspase-3 ist eine Effektorcaspase und ist u. a. am Abbau der Zellmembran sowie einem Teil des Zytoskeletts beteiligt und aktiviert außerdem Nukleasen für den gezielten Abbau der Desoxyribonukleinsäuren (DNA). Darüber hinaus spaltet die aktive Caspase-8 das Protein Bid (*BH3 interacting domain death agonist*), welches dann an Mitochondrien binden kann

und somit die Freisetzung von Cytochrom c ins Zytosol bewirkt [27]. Die Induktion der Apoptose durch Freisetzung von Cytochrom c wird auch als intrinsischer Weg bezeichnet und wird auch durch weitere Faktoren bspw. das Tumorsuppressorprotein p53 oder durch Schäden innerhalb der Zelle und der Mitochondrien ausgelöst [27]. Cytochrom c bindet gemeinsam mit Desoxyadenosin triphosphat (dATP) an das Protein Apaf-1 (*Apoptotic protease activating factor 1*), wodurch eine Konformationsänderung des Proteins hervorgeht und es somit an die Procaspase-9 binden kann. Dies bewirkt die Aktivierung der Caspase-9, welche dann ebenfalls die Caspase-3 aktiviert [27]. Neben der Aktivierung der Caspasen steigt außerdem die Ca^{2+} -Konzentration innerhalb der Zelle an. Durch die erhöhte Ca^{2+} -Konzentration wird die Translokase inhibiert und die Scramblase aktiviert, was zur Folge hat, dass Phosphatidylserin externalisiert wird [28].

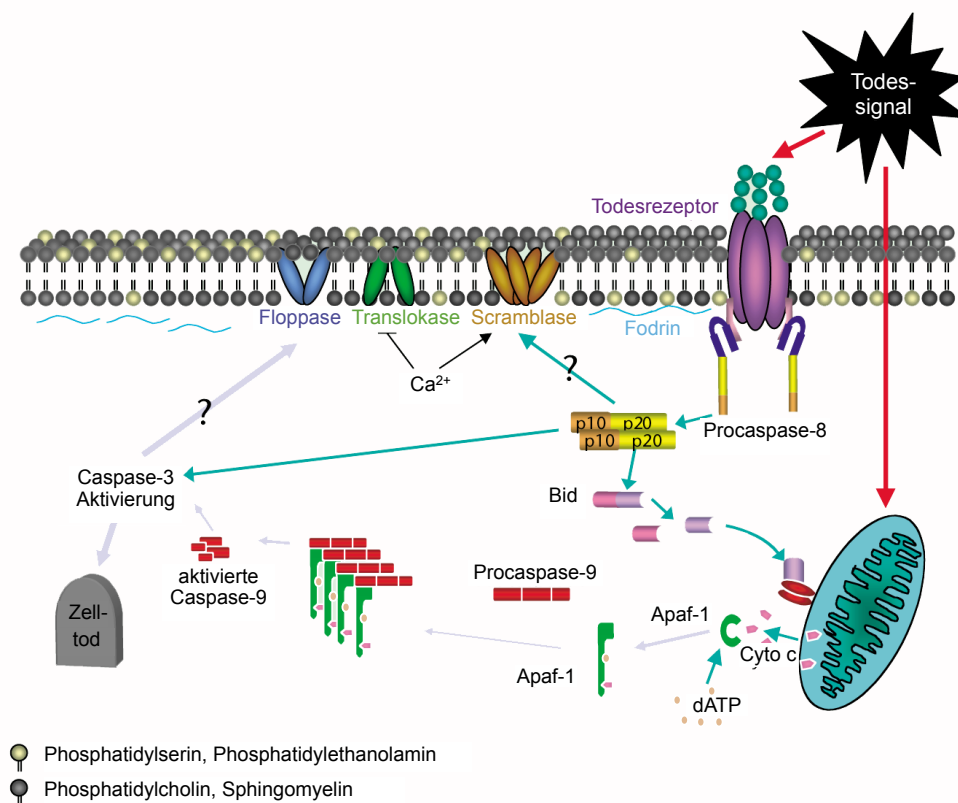


Abbildung 2.1: Signalkaskade der Apoptose und Externalisierung von Phosphatidylserin [25].

Bindet ein Ligand an den Todesrezeptor wird Caspase-8 aktiviert, welche wiederum Caspase-3 aktiviert. Aktive Caspase-8 spaltet außerdem das Protein Bid, welches durch Anlagerung an die Mitochondrien die Freisetzung von Cytochrom c bewirkt. Cytochrom c bindet mit dATP an das Protein Apaf-1, welches zur Aktivierung von Caspase-9 führt. Caspase-9 aktiviert ebenfalls Caspase-3, welche aktiv am Abbau der Zellmembran beteiligt ist. Außerdem steigt die Ca^{2+} -Konzentration an, wodurch die Translokase gehemmt und die Scramblase aktiviert wird. Dies hat die Externalisierung von Phosphatidylserin zur Folge.

Phosphatidylserin ist ein Phospholipid (Abbildung 2.2), welches einen großen Bestandteil der Zellmembran ausmacht und sich normalerweise in der inneren Lipidschicht der Zellmembran befindet [29, 30]. Durch die Auslösung der Caspase-Kaskade und dem Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration innerhalb der Zelle verändert sich zudem die Morphologie der Zelle und sie kann organisiert abgebaut werden [26]. Die Zelle schrumpft, wobei die Membran eine gewisse Bläschenform ausbildet. Aus den Bläschen bilden sich später Vesikel, die sogenannten *apoptotic bodies*, welche über Phagozytose von Makrophagen oder phagozytierenden Nachbarzellen aufgenommen und abgebaut werden [27]. Das externalisierte Phosphatidylserin dient dabei als Erkennungssignal für die Makrophagen [29].

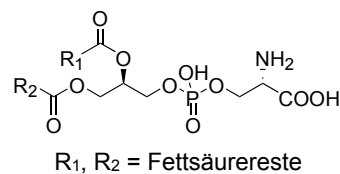


Abbildung 2.2: Strukturformel von Phosphatidylserin. Das Phospholipid ist neben Phosphatidylcholin ein großer Bestandteil der Zellmembran und wird bei der Apoptose externalisiert [30].

An das negativ geladene Phosphatidylserin bindet mit hoher Affinität auch Annexin A5 [30, 31]. Annexin A5 ist ein humanes Protein mit einem Molekulargewicht von 35,7 kDa (Abbildung 2.3) und besteht aus 320 Aminosäuren [31, 32]. Es gehört der Annexin-Familie an, welche alle membranbindende Proteine sind und ähnliche strukturelle Eigenschaften sowie biologische Aktivitäten aufweisen [31]. Bis auf Annexin A6, verfügen alle Annexine über vier Domänen mit jeweils ca. 70 Aminosäuren. Darüber hinaus binden alle calciumabhängig an negativ geladene Phospholipide. Die Bedeutung der einzelnen Annexine ist nicht vollständig bekannt, wird jedoch häufig mit intrazellulären Prozessen in Verbindung gebracht. Mittels Röntgenkristallographie wurde gezeigt, dass sich die vier Domänen des Annexin A5 zyklisch anordnen, wodurch sich eine leicht gebogene Form des Proteins ergibt und man von einer konkaven und einer konvexen Seite des Proteins spricht (Abbildung 2.3) [33]. Dabei befinden sich die Ca^{2+} -Bindungstaschen und die Phosphatidylserin-Bindungsstellen auf der konvexen Seite des Proteins [31, 34].

Die Funktionen von Annexin A5 basieren auf der Bindung an Phosphatidylserin [31]. So spielt Annexin A5 bspw. eine Rolle bei der Blutgerinnung. Durch die Bindung an Phosphatidylserin steht es in Konkurrenz mit dem Prothrombinase-Komplex und verhindert die Bildung von Thrombin, wodurch es als Antikoagulanzen wirkt [31, 36-38]. Darüber hinaus kann Annexin A5 die Phagozytose inhibieren, indem es die Phosphatidylserine abschirmt [39]. Es übernimmt damit eine Aufgabe bei der Regulierung des Immunsystems [40]. Außerdem kann Annexin A5 den Verlauf der Apoptose beeinflussen, indem es je nach Zelltyp die Apoptose beschleunigt [41] oder verzögert [42].

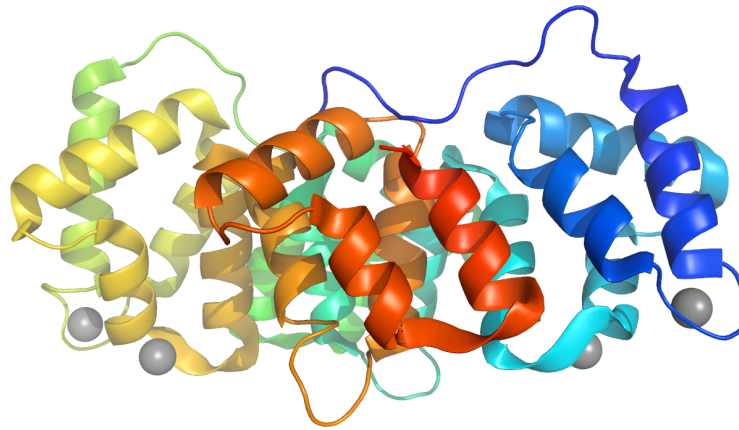


Abbildung 2.3: Annexin A5 [35]. Das Protein hat eine Größe von 35,7 kDa und verfügt über 320 Aminosäuren [32]. Aufgrund der Zusammenlagerung der vier Domänen hat das Protein eine leicht gebeugte Konformation mit einer konkaven und einer konvexen Seite. Die Ca²⁺-Bindungstaschen und somit die Bindungsstellen für das Phosphatidylserin befinden sich auf der konvexen Seite des Annexin A5 [31, 33, 34]. Das koordinierte Calcium ist durch die grauen Sphären dargestellt.

2.1.2. Extrazelluläre Matrix und Matrixmetalloproteinasen

Die extrazelluläre Matrix beschreibt das Material und Gewebe, welches die Zellen im Interzellularraum umgibt [43]. Die extrazelluläre Matrix setzt sich aus verschiedenen Bausteinen zusammen, die je nach Lokalisation variieren. Zu den Hauptbestandteilen gehören Proteine (besonders Kollagene und Proteoglykane) sowie Polysaccharide (z. B. Glykosaminoglykane) [43, 44]. Des Weiteren werden zahlreiche Nährstoffe (z. B. Aminosäuren und Glukose) aber auch Wachstumsfaktoren, Zytokine, Rezeptorproteine und Adhäsionsmoleküle an- und abtransportiert [45]. Die Aufgabe der extrazellulären Matrix besteht neben der Nährstoffversorgung der Zellen, auch in der Regulation der Zellfunktion und des Zellwachstums. Die Interaktion der Zellen mit der extrazellulären Matrix wird dabei über Rezeptoren wie Integrine gesteuert [46]. Um gesundes Gewebe aufrechtzuerhalten, regeneriert sich die extrazelluläre Matrix und wird umgebaut, wobei alte oder beschädigte Proteine abgebaut und durch neue Proteine ersetzt werden [44]. Zu den wichtigsten Enzymen, die am Umbau der extrazellulären Matrix beteiligt sind, gehören die Matrixmetalloproteinasen (MMP) [14]. Dieser normale Umbau ist jedoch häufig bei Krankheiten nicht gegeben und es herrscht ein Ungleichgewicht. Dies hat zur Folge, dass sich die Zusammensetzung und die Qualität der Matrix ändert [14, 16].

In diesem Zusammenhang wurde häufig auch eine erhöhte Aktivität der MMP nachgewiesen. MMP katalysieren zinkabhängig die Spaltung der Matrixproteine durch Hydrolyse. Es gibt über 25 verschiedene MMP, die je nach Funktion bzw. Substratspezifität in vier verschiedene Gruppen eingeteilt werden (Tabelle 2.1) [14]. Wie aus Tabelle 2.1 ersichtlich, gibt es bei den

Substraten der verschiedenen MMP große Überschneidungen. Somit wird gewährleistet, dass unter verschiedenen Bedingungen ausgehend von den unterschiedlichen Zelltypen und Gewebearten der Umbau der extrazellulären Matrix stattfindet. Darüber hinaus kann so ein Enzym die Aufgabe eines anderen Enzyms übernehmen, sollte dies in inaktiver Form vorliegen oder durch krankhafte Veränderungen nicht mehr exprimiert werden [14]. Alle MMP verfügen über eine Zink-Bindungsdomäne, eine aktive Enzym-Domäne und eine Propeptid-Domäne [14]. Die Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 verfügen mit der Gelatin-Bindungsdomäne über eine weitere Domäne. Im inaktiven Zustand der Enzyme koordiniert die Cysteinseitenkette des Propeptids mit der Zink-Bindungsdomäne. Durch Abspaltung des Propeptids werden MMP aktiviert und die Zink-Bindungsdomäne kann zweiwertiges Zink koordinieren [14]. Die Aktivität der MMP wird über Genexpression bzw. der Inhibierung aktiver MMP reguliert [47]. Die Expression wird durch Zytokine, Wachstumsfaktoren sowie Zell-Matrix- und Zell-Zell-Wechselwirkungen induziert. Durch physikalischen Stress, Tumor-Promotoren und onkogene Veränderungen kann die MMP-Expression ebenfalls ausgelöst werden. Die gezielte Inhibierung von MMP wird durch natürlich vorkommende Inhibitoren, den sogenannten *tissue inhibitors of metallo-proteinases* (TIMP), erreicht.

Dass MMP eine entscheidende Rolle in der Pathogenese und insbesondere bei der Angiogenese und Metastasierung spielen, wurde sowohl in zahlreichen Tierexperimenten aber auch in Humanstudien gezeigt. Abbildung 2.4 fasst den Einfluss von MMP auf das Wachstum von Tumorzellen, die Angiogenese und die Metastasierung zusammen [47]. Während die Degradierung der Matrix bei Entzündungen gewollt ist, um so die Wanderung von Leukozyten zu ermöglichen, erlaubt sie andererseits auch die Wanderung von Tumorzellen in weitere Gewebe sowie die Ausbildung neuer Blutgefäße [50, 51]. Die Degradierung der extrazellulären Matrix durch MMP bewirkt zudem die Freisetzung von Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Rezeptoren und Adhäsionsmolekülen, welche dann wiederum einen Einfluss auf Zellwachstum, Angiogenese und Metastasierung ausüben. Es konnte nachgewiesen werden, dass MMP-9 direkt die Spaltung von Galectin-3, dem Wachstumsfaktor TGF- β (*transforming growth factor- β*) und Plasminogen bewirkt, welche alle die Einwanderung von Tumorzellen und die Angiogenese regulieren [47]. Außerdem besteht ein möglicher Zusammenhang zwischen der Degradierung der extrazellulären Matrix durch MMP-9 und der gezielten Freisetzung von VEGF (*vascular endothelial growth factor*), der ebenfalls an der Angiogenese beteiligt ist [52].

Tabelle 2.1: Übersicht ausgewählter MMP und einige ihrer Substrate [14, 47-49].

Familie	Enzym	Substrat
Kollagenasen	MMP-1 (Kollagenase-1)	Kollagen Typ I, II, III, VII, VIII, X Aggrecan Gelatin
	MMP-8 (Kollagenase-2)	Kollagen Typ I, II, III, V, VII, VIII, X Aggrecan Elastin Fibronectin Gelatin Laminin
	MMP-13 (Kollagenase-3)	Kollagen Typ I, II, III, IV Aggrecan Gelatin
Gelatinasen	MMP-2 (Gelatinase A)	Kollagen Typ I, II, III, IV, V, VII, X, XI Aggrecan Elastin Fibronectin Gelatin Laminin
	MMP-9 (Gelatinase B)	Kollagen Typ IV, V, VII, X, XIV Aggrecan Elastin Fibronectin Gelatin
Stromelysine	MMP-3 (Prokollagenase, Stromelysin-1)	Kollagen Typ II, III, IV, V, VII, X, XIV Aggrecan Elastin Fibronectin Gelatin Laminin
	MMP-10 (Stromelysin-2)	Kollagen Typ III, IV, V Aggrecan Elastin Fibronectin Gelatin Laminin
	MMP-11 (Stromelysin-3)	Aggrecan Fibronectin Laminin
Membrantyp-MMP (MT-MMP)	MMP-14 (MT1-MMP)	Kollagen Typ I, II, III Aggrecan Elastin Fibronectin Gelatin Laminin
	MMP-15 (MT2-MMP)	Fibronectin Gelatin Laminin

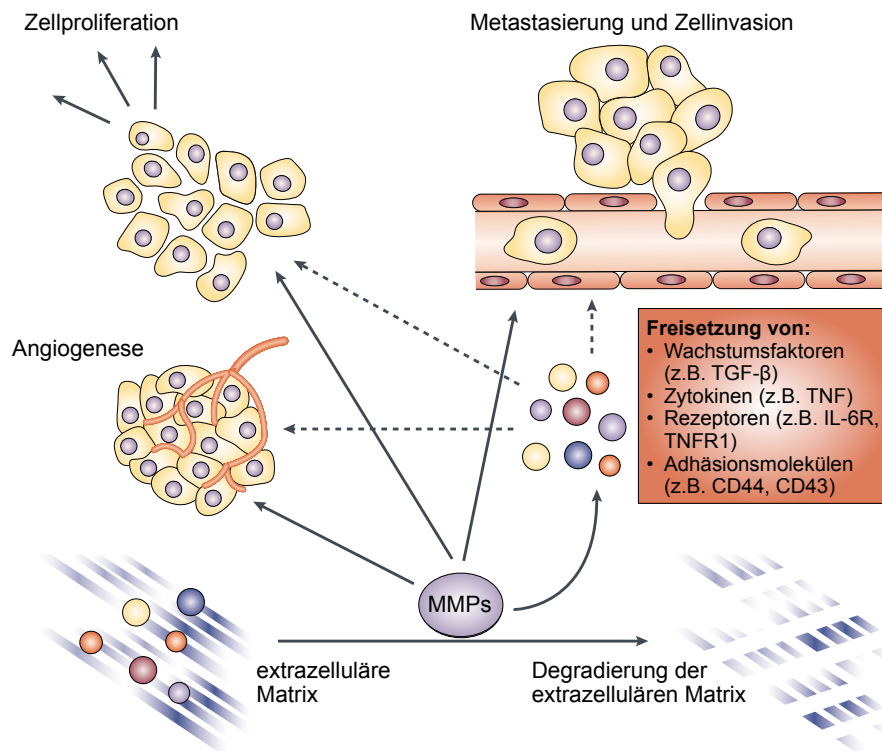


Abbildung 2.4: Die Rolle von MMP bei Tumorzellwachstum, Angiogenese und Metastasierung [47]. Die Degradierung der extrazellulären Matrix durch MMP bewirkt die Freisetzung von Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Rezeptoren und Adhäsionsmolekülen. Die Zellproliferation, Angiogenese sowie die Zellwanderung und Metastasierung werden durch die Freisetzung und der Degradierung selbst begünstigt.

2.2. Molekulare Bildgebung

2.2.1. Übersicht verschiedener bildgebender Verfahren und molekularer Bildgebungs sonden

Die molekulare Bildgebung greift auf verschiedene nicht-invasive bildgebende Verfahren zurück, welche sich in ihrer Anwendung sowie der Auflösung und der Anforderung an die Bildgebungs sonden unterscheiden [2, 3]. Während zunächst nukleare Bildgebungsverfahren wie PET und SPECT in der molekularen Bildgebung Anwendung fanden, kam es später durch die Entwicklung einer Vielzahl von Sonden auch verstärkt zum Einsatz weiterer Techniken wie der MRT oder der optischen Bildgebung [3, 53]. Die MRT liefert sowohl molekulare als auch anatomische Informationen, während die optische Bildgebung, SPECT und PET hingegen meist mit der Computertomographie (CT) kombiniert werden, um so die anatomischen Informationen zu erhalten [2, 5]. Tabelle 2.2 fasst die wichtigsten Verfahren und Techniken zusammen.

2. Stand der Forschung

Tabelle 2.2: Übersicht verschiedener bildgebender Verfahren [2, 3]. NIR: nahinfrarot, A: anatomisch, M: molekular, P: physiologisch.

	MRT	CT	PET	SPECT	optische Bildgebung
Messtechnik zur Bildgenerierung	Radiowellen	Röntgenstrahlen	γ -Strahlung	γ -Strahlung	sichtbares Licht, Nahinfrarot-Licht
Auflösung	25-100 μm	50-200 μm	1-2 mm	1-2 mm	2-3 mm
Eindringtiefe	-	-	-	-	<1 cm
Zeit	Min - Std	Min	10 Sek bis Min	Min	Sek bis Min
Empfindlichkeit	$10^{-3} - 10^{-5} \text{ mol/l}$ 10^{-9} mol/l (partikelbezogen) [13]	unzureichend charakterisiert	$10^{-11} - 10^{-12} \text{ mol/l}$	$10^{-10} - 10^{-11} \text{ mol/l}$	unzureichend charakterisiert
Kontrastmittel	Gadolinium Eisenoxidpartikel	Iod	^{18}F ^{11}C ^{15}O	$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Chelate ^{111}In -Chelate	NIR-Farbstoffe Fluorochrome
Anwendung	A, M, P	A, P	P, M	P, M	P, M
Vorteile	höchste räumliche Auflösung vereint anatomische und molekulare Bildgebung stabile Sonden	Bildgebung von Knochen anatomische Bildgebung	höchste Sensitivität Isotope können natürlich vorkommende Atome ersetzen	hohe Sensitivität Bildgebung mehrerer Proben gleichzeitig	hohe Sensitivität Bildgebung mehrerer Proben gleichzeitig stabile Sonden
Nachteile	relativ niedrige Empfindlichkeit lange Messzeiten, Nachbearbeitung hoher Probeneinsatz	molekulare Bildgebung begrenzt geringer Weichteilkontrast Strahlenbelastung	relativ niedrige Auflösung Strahlenbelastung	relativ niedrige Auflösung Strahlenbelastung	relativ niedrige räumliche Auflösung begrenzte Eindringtiefe

Kontrastmittel eignen sich als molekulare Bildgebungssonden, wenn sie eine hohe Affinität zum Zielmolekül bzw. -gewebe aufweisen und sich somit spezifisch sowie in ausreichender Konzentration anreichern [1]. Ferner müssen sie eine geringe Immunogenität aufweisen und ausreichend lange zirkulieren [1]. Beim Sondendesign muss außerdem die Größe der molekularen Bildgebungssonde berücksichtigt werden, da diese einen Einfluss auf die Extravasation und die Verstoffwechselung der Sonde hat [1, 3]. Um die genannten Kriterien zu erfüllen, bestehen molekulare Bildgebungssonden in der Regel aus einem zielgerichteten Molekül (z. B. Peptide, Proteine, Antikörper oder DNA) und einem Reporteratom bzw. -molekül, das letztlich das Signal sendet oder verstärkt [1]. Die Wahl des Reporters hängt dabei von dem genutzten bildgebenden Verfahren ab (Tabelle 2.2, Kontrastmittel). Durch die Kopplung des

Reporters an das zielgerichtete Molekül findet die spezifische Bindung der Sonde an den gewählten Rezeptor statt. Neben dem zielgerichteten Molekül und dem Reporter werden einige Sonden außerdem mit Polymeren (z. B. Polyethylenglykol (PEG)) modifiziert, infolgedessen sich die Bluthalbwertszeit verlängert und die Immunogenität verringert wird [54].

Schematisch lassen sich Bildgebungssonden in drei Klassen einteilen: unspezifisch, zielgerichtet und aktivierbar (Abbildung 2.5), welche im Folgenden erläutert werden [53, 55].

Unspezifische Bildgebungssonden

Unspezifische Sonden (Abbildung 2.5a) werden hauptsächlich zur Untersuchung der Vaskularisation und des Blutvolumens eingesetzt [55]. Sie eignen sich nur bedingt als molekulare Bildgebungssonden, da sie in der Regel nur die späteren physiologischen Änderungen aufzeigen können. Der Einsatz unspezifischer Sonden ist trotzdem weit verbreitet, weil auch hier ein großer Informationsgewinn durch die Sonden erreicht wird, z. B. durch die Anreicherung in Tumoren und Entzündungsherden aufgrund einer pathologisch erhöhten Durchlässigkeit der Gefäße [56, 57]. Die Akkumulation der Sonden zeigt jedoch auch, dass es absolut unspezifische Sonden eigentlich nicht gibt. Auch wenn die Sonden nicht über ein zielgerichtetes Molekül verfügen, besteht abhängig vom Sondendesign eine Affinität zu bestimmten Gebieten z. B. der Leber oder der Niere [58].

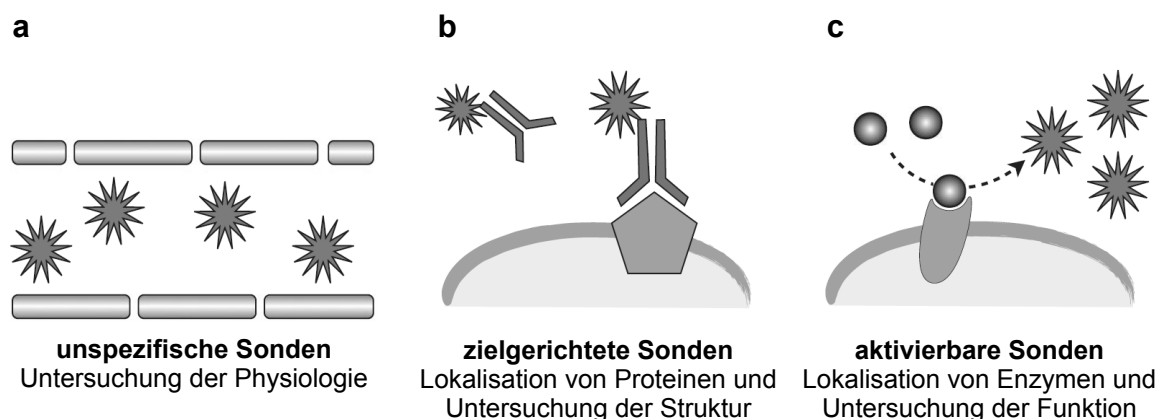


Abbildung 2.5: Verschiedene molekulare Bildgebungssonden [55]. (a) Unspezifische Sonden verteilen sich nach der Injektion intravaskulär und eignen sich zur Untersuchung des Blutvolumens oder zur Angiographie. **(b)** Zielgerichtete Sonden verfügen über einen Liganden, z. B. Antikörper, die spezifisch an die Rezeptoren binden. **(c)** Aktivierbare Sonden sind zum Zeitpunkt der Injektion inaktiv und senden kein oder ein schwächeres Signal. Erreichen sie das Zielgewebe mit den gewählten aktiven Enzymen, werden sie aktiviert. Dadurch ändert sich bspw. die Konformation und infolgedessen die Signalintensität der Sonde.

Ein Beispiel für eine unspezifische MRT-Bildgebungssonde sind VSOP. Dies sind sehr kleine Eisenoxidpartikel, welche über eine negativ geladene Citrathülle verfügen [59]. Die vergleichsweise dünne Hülle der VSOP hat zur Folge, dass sich die Größe des Eisenkerns (ca. 5 nm) nur unwesentlich vom hydrodynamischen Durchmesser (ca. 7 nm) des Partikels unterscheidet [53, 60]. VSOP sind deutlich kleiner als andere Eisenoxidpartikel für die MRT, die magnetischen Eigenschaften sind jedoch vergleichbar oder besser, so dass VSOP bereits erfolgreich für die MRT-Angiographie eingesetzt und präklinischer sowie klinischer Prüfung unterzogen wurden [59-62].

Zielgerichtete Bildgebungssonden

Zielgerichtete Bildgebungssonden eignen sich z. B. zur Lokalisation von Proteinen und der Untersuchung der Struktur. Sie tragen einen Liganden (z. B. Antikörper) mit hoher Affinität zu einem gewählten Rezeptor [2, 53, 63]. Die hohe Affinität bewirkt eine spezifische Anreicherung der Sonde im Zielgewebe, infolgedessen eine Signaländerung gemessen werden kann (Abbildung 2.5b). Eine deutliche Signaländerung ist dann zu messen, wenn sich zum Zeitpunkt der Messung die ungebundene Sonde nicht mehr im Blutkreislauf befindet und nur noch die spezifisch gebundene Sonde im Zielgewebe das Signal beeinflusst [3]. Wird der Zeitpunkt der Messung zu früh gewählt, wird das spezifische Signal durch ein zu hohes Hintergrundsignal geschwächt. Der Wahl des Liganden geht die Wahl eines geeigneten Rezeptors oder Zielgewebes voraus.

Die Funktionalisierung von unspezifischen Kontrastmitteln mit Annexin A5 erzielt zielgerichtete Sonden für die Apoptose-Bildgebung [64-68]. Für die MRT wurden bereits verschiedene Eisenoxidpartikel mit Annexin A5 gekoppelt und erfolgreich getestet [17, 67, 69-71]. In einem Mausmodell bei dem Ischämie induziert wurde, wurde eine spezifische Anreicherung der mit AnnexinA5-funktionalisierten Partikel (AnnexinA5-CLIO) im Herzmuskel erreicht [67, 71]. Die Anbindung von Annexin A5 an VSOP (AnnexinA5-VSOP) erzielte darüber hinaus Partikel mit einem hydrodynamischen Durchmesser von nur 15 nm. Sie stellen die kleinsten Apoptosonden auf Basis von Eisenoxidpartikeln dar und weisen möglicherweise eine verbesserte Bioverfügbarkeit auf [17].

Aktivierbare Bildgebungssonden

Mit Hilfe aktivierbarer Sonden lassen sich z. B. aktive Enzyme lokalisieren und deren Funktion untersuchen. Sie sind zum Zeitpunkt der Injektion inaktiv und verändern ihre chemischen oder physikochemischen Eigenschaften aufgrund der Bindung oder Reaktion mit dem Zielmolekül (Abbildung 2.5c) [55]. Der Vorteil aktivierbarer Sonden gegenüber zielgerichteten Sonden besteht darin, dass kein oder nur ein schwaches Hintergrundsignal geliefert wird. Damit aktivierbare Sonden auch spezifisch aktiviert werden und somit eine spezifische Sig-

naländerung auftritt, tragen sie ebenfalls eine zielgerichtete Molekülgruppe. Je nach Art der Aktivierung sind dies bspw. komplementäre DNA-Stränge oder enzymatisch spaltbare Peptide.

Ein Großteil der aktivierbaren Sonden beruht auf dem Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) [72, 73]. Dabei wird die Fluoreszenz des ersten Fluorophors (Donor) gelöscht, indem die Anregungsenergie strahlungslos auf den benachbarten zweiten Fluorophor (Akzeptor) übertragen wird. Dies ist abhängig vom Abstand zwischen Donor und Akzeptor sowie der spektralen Überlappung der Donor-Fluoreszenz und der Akzeptor-Absorption. Im inaktiven Zustand der Sonde befinden sich Donor und Akzeptor in räumlicher Nähe und die Fluoreszenz des Donors wird gelöscht [5, 12, 74]. Im aktiven Zustand hat sich der Abstand zwischen Donor und Akzeptor vergrößert und der Donor fluoresziert. Bei den sogenannten *Molecular Beacons* erfolgt dies durch Hybridisierung komplementärer DNA-Stränge, infolgedessen sich die vorher zusammengelagerten Sequenzen öffnen und sich der Abstand zwischen Donor und Akzeptor vergrößert [75]. Basierend auf den *Molecular Beacons* wurden ferner auch *Peptide Beacons*, bestehend aus einer Peptid-Erkennungssequenz aus hybridisierten Peptidnukleinsäuren, entwickelt, welche sich nach der Bindung an ein Protein öffnen [76].

Trägt die aktivierbare Sonde eine spezifische Schnittstelle für ein gewähltes Enzym, lassen sich Enzymaktivitäten darstellen. Bremer *et al.* haben bspw. eine MMP-2-aktivierbare Sonde für die Fluoreszenz-Bildgebung hergestellt [12]. Dabei ist an die Lysinseitenketten eines Polylysin-Rückgrats jeweils ein Peptid gebunden, welches wiederum einen Fluoreszenzfarbstoff trägt. Innerhalb des Peptids befindet sich ferner eine spezifische Schnittstelle für die MMP-2. Aufgrund der räumlichen Nähe der Farbstoffe zueinander, sendet die Sonde zunächst nur ein geringes Signal aus. Infolge der enzymatischen Spaltung des Peptids, entfernen sich jedoch die Farbstoffe voneinander und die Fluoreszenz steigt an.

Bei aktivierbaren Sonden für die MRT ändert sich das Signal in Folge von Zusammenlagerung oder Anreicherung der Partikel. Die so hervorgerufene Kontrastverstärkung wird auch als „*magnetic switch*“ bezeichnet [13, 77-80]. Die Aggregation bzw. Zusammenlagerung kann durch Enzyme bzw. Anlagerung von Antikörpern oder aber durch Anlegen eines magnetischen Feldes erfolgen [21, 81-83]. Basierend auf den elektrostatisch stabilisierten VSOP wurden protease-spezifische Eisenoxidpartikel (PSOP) hergestellt und bereits erfolgreich *in vitro* getestet [13]. Die PSOP sind zunächst durch eine PEG-Hülle sterisch stabilisiert und tragen eine Schnittstelle für die Proteasen MMP-2 und MMP-9. Infolge der enzymatischen Spaltung verlieren die PSOP die PEG-Ketten und somit ihre sterische Stabilisierung, wodurch sie letztlich aggregieren.

2.2.2. Grundlagen der Magnetresonanztomographie und die Wirkung von MRT-Kontrastmitteln

Physikalische Grundlagen der MRT

Atomkerne, die über eine ungerade Anzahl von Protonen und / oder Neutronen verfügen, haben in ihrem Grundzustand einen von Null verschiedenen Kernspin, mit dem ein magnetisches Kernmoment verknüpft ist. Das magnetische Kernmoment ist das Produkt aus dem Kernspin und dem gyromagnetischen Verhältnis (Proportionalitätskonstante) und bildet die Grundlage der magnetischen Resonanz. Für die MRT wird überwiegend der Kern des Wasserstoffatoms ^1H genutzt, da dieses am häufigsten in biologischen Geweben vorkommt und von allen stabilen Isotopen das größte gyromagnetische Verhältnis aufweist. [84]

Im feldfreien Raum sind die magnetischen Momente ungeordnet und kompensieren sich gegenseitig. Bringt man die Probe jedoch in ein äußeres Magnetfeld, richten sich die magnetischen Momente der Atomkerne entweder parallel oder antiparallel zum äußeren Magnetfeld aus und das magnetische Moment präzediert um die Richtung des angelegten Magnetfeldes. Durch die stärkere Besetzung des parallelen, energieärmeren Zustandes bildet sich in Richtung des äußeren Magnetfeldes eine messbare makroskopische Magnetisierung aus, welche auch als Longitudinalmagnetisierung (Längsmagnetisierung) bezeichnet wird (Abbildung 2.6, links). Die Induktion eines elektromagnetischen Hochfrequenzfeldes (HF-Radioimpuls), welches die gleiche Frequenz wie die Präzessionsbewegung der magnetischen Momente (Larmorfrequenz) aufweist (Resonanz), ermöglicht einen Übergang zwischen den Energieniveaus und bewirkt die Drehung der Magnetisierung (Abbildung 2.6, rechts). Die Longitudinalmagnetisierung nimmt infolgedessen ab. Der HF-Radioimpuls bewirkt außerdem eine Phasensynchronisation bei einem Teil der magnetischen Momente, so dass sich eine Transversalmagnetisierung (Quermagnetisierung) ausbildet. [84]

Nach einer HF-Anregung kehrt das System in den thermischen Gleichgewichtszustand zurück (Relaxation). Man unterscheidet dabei die longitudinale und transversale Relaxation. Bei der longitudinalen Relaxation (Spin-Gitter-Relaxation, T1-Relaxation) findet eine Umbesetzung der Spinzustände statt und das Spinsystem gibt die aufgenommene Energie an das „Gitter“, d.h. an die Gesamtheit der Atome und Moleküle, in die die Kernspins eingebaut sind, ab. Die longitudinale Magnetisierung nimmt dabei wieder zu. Die transversale Relaxation (Spin-Spin-Relaxation, T2-Relaxation) beschreibt die Dephasierung der magnetischen Momente aufgrund von Spin-Spin-Wechselwirkungen. In Kombination mit der Dephasierung infolge von Feldinhomogenitäten wird sie als T2*-Relaxation bezeichnet. Die transversale Magnetisierung nimmt dabei ab. Beide Prozesse beschreiben eine exponentielle Kurve (Abbildung 2.7). Die T1- und T2-Relaxation verlaufen gleichzeitig, wobei die T2-Relaxation jedoch wesentlich schneller als die T1-Relaxation abläuft. [84]

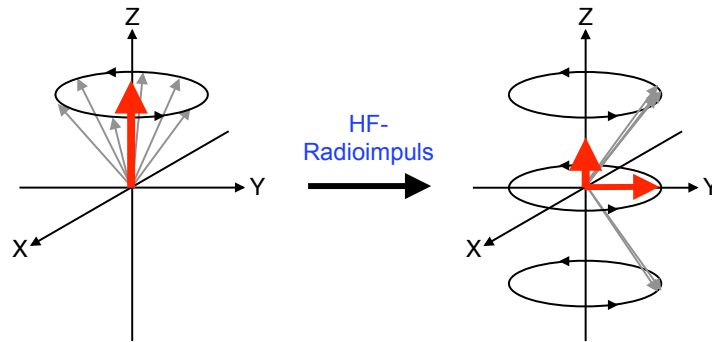


Abbildung 2.6: Präzessionsbewegung der magnetischen Momente im Magnetfeld und nach Einsenden eines HF-Radioimpulses [84]. Die magnetischen Momente (graue Pfeile) präzedieren um die Feldrichtung entlang der Z-Achse. Das Einsenden eines HF-Radioimpulses ermöglicht einen Übergang der magnetischen Momente zwischen den Energieniveaus. Die Magnetisierung wird gedreht und die Longitudinalmagnetisierung entlang der Z-Achse nimmt ab. Außerdem wird die Präzessionsbewegung der magnetischen Momente synchronisiert. Das bewirkt eine Transversalmagnetisierung in der X-Y-Ebene. Dargestellt sind nur die magnetischen Momente, die anisotrop auf die Präzessionskegel verteilt sind.

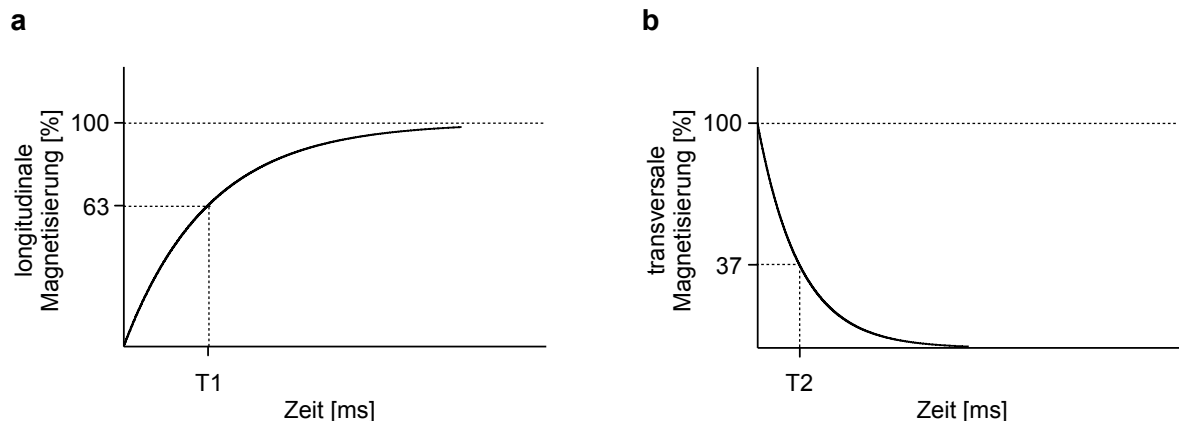


Abbildung 2.7: Relaxation der longitudinalen und transversalen Magnetisierung [84]. Die Zeitkonstante T_1 beschreibt die Zeit, bei der 63 % der ursprünglichen Longitudinalmagnetisierung wieder erreicht sind (**a**). Die Zeitkonstante T_2 beschreibt die Zeitspanne bis nur noch 37 % der ursprünglichen Transversalmagnetisierung vorliegen (**b**).

Der erhaltene Bildkontrast ergibt sich aus den unterschiedlichen Relaxationszeiten der verschiedenen Gewebe [84-86]. In T_1 -gewichteten MRT-Bildern erscheinen wässrige Flüssigkeiten dunkel und Fett erscheint hell. In T_2 -gewichteten MRT-Bildern hingegen erscheinen wässrige Flüssigkeiten hell und Fett dunkel. Ob das erhaltene Bild T_1 - oder T_2 -gewichtet ist, wird dabei hauptsächlich durch die Messparameter Repetitionszeit (TR) und Echozeit (TE) beeinflusst. Die Repetitionszeit bezeichnet die Zeit, nach der die verwendete Impulsfolge wiederholt wird. Die Echozeit gibt an, zu welchem Zeitpunkt nach dem ersten Anregungsimpuls die Messung des Signals stattfindet. [86]

Wirkung von MRT-Kontrastmitteln

Kontrastmittel bewirken grundsätzlich eine Verkürzung der Relaxationszeiten der umliegenden Wasserstoffatomkerne und führen so zu einer Signalzunahme in der T1-gewichteten Bildgebung und einer Signalabnahme in der T2- und T2*-gewichteten Bildgebung und infolgedessen zu einem höheren Kontrast. Das Maß eines Kontrastmittels, also die Fähigkeit zur Reduzierung der T1-, T2- und T2*-Relaxationszeiten, wird durch die Relaxivitäten R1 und R2 [$\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$] beschrieben. Die Relaxivitäten R1 und R2 stehen im proportionalen Zusammenhang mit den reziproken Relaxationszeiten T1 bzw. T2 und sind abhängig von der Temperatur und der Stärke des angelegten Magnetfeldes. Umso höher die Relaxivitäten, desto stärker der verkürzende Einfluss auf die Relaxationszeiten T1 bzw. T2. [84, 86]

Als MRT-Kontrastmittel eignen sich paramagnetische und superparamagnetische Stoffe, welche über ungepaarte Elektronen verfügen und somit ein magnetisches Moment aufweisen, was zu einer lokalen Erhöhung der Feldstärke führt. Die am häufigsten genutzten Kontrastmittel für die MRT sind Gadolinium-Chelate (paramagnetisch) oder Eisenoxidverbindungen (superparamagnetisch) [62, 77]. Paramagnetische Substanzen ermöglichen aufgrund der ähnlichen Larmor-Frequenz einen schnellen Energieaustausch zwischen den Protonen des Gewebes und den ungepaarten Elektronen des Kontrastmittels, wodurch die T1-Relaxation beschleunigt wird und somit die Longitudinalmagnetisierung wieder zunimmt. Sie werden daher häufig in Kombination mit T1-gewichteten Messungen eingesetzt und führen dann zu einer Signalverstärkung. Vorher dunkles Blut wird durch die Gabe von T1-Kontrastmitteln hell. [84, 86] Superparamagnetische Kontrastmittel beeinflussen lokal die Homogenität des von außen angelegten Magnetfeldes aufgrund des besonders hohen magnetischen Moments der Partikel [84]. Sie bewirken eine schnellere Dephasierung der Protonenpräzession, wodurch die transversale Magnetisierung schneller abnimmt. Sie eignen sich somit als Kontrastmittel für T2-gewichtete Messungen und führen zu einer Signalverminderung [84, 86]. Grau erscheinende Gewebe wie Leber erscheinen nach Kontrastmittelaufnahme dunkler bis schwarz. Superparamagnetische Eisenoxidpartikel eignen sich insbesondere auch als T2*-Kontrastmittel [13, 17, 87]. Da bei der T2*-gewichteten Bildgebung die, durch diese Partikel hervorgerufenen, statischen Feldinhomogenitäten nicht ausgeglichen werden, haben Eisenoxidpartikel hier einen noch stärkeren Einfluss auf die Dephasierung und infolgedessen auf den Kontrast.

2.3. Konjugatsynthese

Konjugatsynthesen erzielen das Verknüpfen zweier oder mehrerer Moleküle (oder Komponenten), wobei die Eigenschaften der Moleküle kombiniert werden und möglichst erhalten bleiben sollen [88, 89]. Im Folgenden soll insbesondere auf die Synthese von Biokonjugaten und die Funktionalisierung von Eisenoxidnanopartikeln mit Biomolekülen bzw. Biokonjugaten eingegangen werden, wobei der Schwerpunkt auf die Konjugation von Peptiden und Proteinen gelegt wird. Die vorgestellten Methoden können jedoch häufig auf andere (Bio-)Moleküle übertragen werden.

2.3.1. Synthese von Biokonjugaten

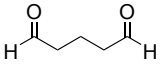
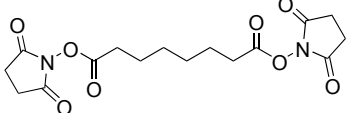
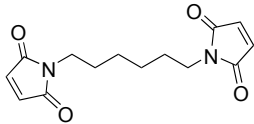
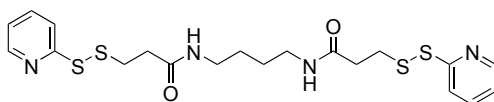
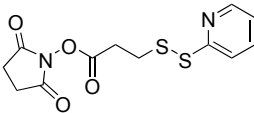
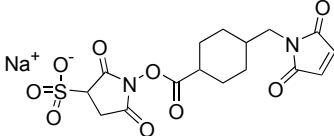
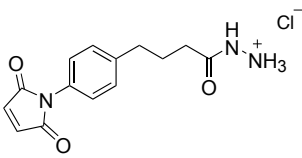
Unter Biokonjugaten versteht man modifizierte Formen von Aminosäuren, Peptiden und Proteinen, Zuckern, Polysacchariden und Glykokonjugaten, Nukleinsäuren und Oligonukleotiden sowie Lipiden [88-90]. Ziele der Biokonjugation sind z. B. die Bioverfügbarkeit und -kompatibilität der Moleküle zu erhöhen [54, 91-94]. Ferner eignen sich Biokonjugate zur Lokalisation und Detektion anderer Biomoleküle und ermöglichen die Untersuchung der Struktur und Funktion von Proteinen und Nukleinsäuren [64, 89, 95, 96]. Sie finden außerdem Anwendung in biochemischen Nachweisverfahren sowie in der Diagnostik und der zielgerichteten Therapie von Krankheiten [20, 95, 97-100].

Generell basieren Konjugatsynthesen auf der chemoselektiven Reaktion funktioneller Gruppen eines Derivatisierungsreagenz mit den funktionellen Gruppen des zu verändernden Moleküls [90]. Die Konjugation natürlicher Peptide oder Proteine erfolgt häufig mit speziellen Kopplungsreagenzien (*cross-linker*), da erstere nur über eine gewisse Anzahl geeigneter funktioneller Gruppen verfügen (ausgehend von den proteinogenen Aminosäuren) [101-103]. Die natürlich vorkommenden funktionellen Gruppen der Peptide bzw. Proteine (z. B. Thiol-, Carboxy- oder Aminogruppen) treten selektiv in Reaktion mit den funktionellen Gruppen der Kopplungsreagenzien (z. B. Maleimid, Carbodiimid oder Succinimidylester), wodurch die Moleküle miteinander verknüpft oder weitere funktionelle Gruppen eingebracht werden [88]. Tabelle 2.3 gibt eine Übersicht einiger bifunktionaler Kopplungsreagenzien, welche in homobifunktional (Konjugation der Moleküle über die gleiche funktionelle Gruppe) oder heterobifunktional (Konjugation der Moleküle über zwei unterschiedliche funktionelle Gruppen) eingeteilt werden. Neben bifunktionalen Kopplungsreagenzien, gibt es auch Reagenzien, die drei oder mehr Komponenten miteinander verknüpfen [88]. Ein konkretes Beispiel für die Verwendung von Kopplungsreagenzien, ist die Konjugation des polykationischen, argininreichen Peptids Protamin mit dem Protein Annexin A5, welches in einer rekombinanten Variante über ein frei zugängliches Cystein verfügt, für die elektrostatische Bindung von Annexin A5 an negativ geladene Eisenoxidnanopartikel [17]. Die N-terminale Aminogruppe des Protamins rea-

2. Stand der Forschung

gierte dabei im ersten Schritt mit dem Succinimidylester des Kopplungsreagenz *N*-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionat (SPDP). Im zweiten Schritt reagierte dann die freie Thiolgruppe des Annexin A5 mit dem Dithiopyridin des SPDP-aktivierten Protamins (Abbildung 2.8a).

Tabelle 2.3: Übersicht verschiedener bifunktionaler Kopplungsreagenzien [88]. DSS: Disuccinimidylsuberat; BMH: Bismaleimidohexan; DPDPB: 1,4-Di-(3'-[2'-pyridyldithio]-propionamido)butan; SPDP: *N*-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionat; Sulfo-SMCC: Sulfosuccinimidyl-4-(*N*-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat Natriumsalz; MPBH: 4-(4-*N*-Maleimidophenyl)butansäurehydrazidhydrochlorid.

funktionelle Gruppe der zu verknüpfen- den Komponenten		reaktive Gruppe des Kopplungs- reagenz	Kopplungsreagenz
homo- bifunktional	-NH ₂	Aldehyd	 Glutaraldehyd
		Succinimidylester	 DSS
	-SH	Maleimid	 BMH
		Dithiopyridin	 DPDPB
hetero- bifunktional	-NH ₂ , -SH	Succinimidylester, Dithiopyridin	 SPDP
		Sulfo- succinimidylester, Maleimid	 Sulfo-SMCC
	-COR bzw. -COH, -SH	Hydrazid, Maleimid	 MPBH

Wegen der begrenzten Anzahl proteinogener Aminosäuren, ergeben sich mitunter viele Wiederholungen der funktionellen Gruppen in den zu modifizierenden Proteinen. Dadurch verlaufen die Konjugationen mit den oben beschriebenen Kopplungsreagenzien nicht immer ortsspezifisch, was einen Bindungs- oder Aktivitätsverlust des Proteins nach sich ziehen kann [104]. Durch gezielte Mutationen können jedoch Aminosäuren ausgetauscht oder eingebracht werden, um so eine einzelne Funktionalität im Protein zu erzeugen [64, 66, 105]. Besonders geeignet ist Cystein, da es eine der seltensten Aminosäuren in Proteinen ist und die Reaktion von bspw. Maleimiden oder Disulfiden mit Thiolen mit hoher Chemoselektivität verläuft [101, 106-108]. Insbesondere die Reaktion von N-terminalem Cystein mit einem C-terminalen Thioester (*native chemical ligation*, NCL) weist eine hohe Spezifität und Selektivität auf (Abbildung 2.8b) [109-112]. Die Thiolgruppe des Cysteins greift das Carbonyl-C-Atom des Thioesters nukleophil an und es bildet sich ein intermediärer Thioester (Umesterung, reversibel), welcher sich spontan zu einer nativen Peptidbindung umlagert (S→N-Acyl-Umlagerung, irreversibel) [112, 113]. Auch in Gegenwart weiterer ungeschützter Cysteine erfolgt die Reaktion regioselektiv, da nur im Falle des N-terminalen Cysteins die irreversible S→N-Acyl-Umlagerung stattfindet.

Durch den rekombinanten Einbau unnatürlicher Aminosäuren (z. B. *p*-Acetylphenylalanin oder *p*-Azidophenylalanin) in Proteine, werden funktionelle Gruppen erzeugt, welche nicht in natürlichen Proteinen vorkommen [114, 115]. Sie sind daher besonders für die chemo- und regioselektive Konjugation geeignet und ihre Reaktionen weisen eine hohe Bioorthogonalität, sprich eine geringe Reaktivität gegenüber natürlich vorkommenden funktionellen Gruppen, auf [102, 116]. Häufig genutzt werden dafür Carbonylgruppen, welche mit Hydraziden bzw. Hydroxylaminen in einer Kondensationsreaktion zu Hydrazonen bzw. Oximen, respektive, reagieren (Abbildung 2.8c, d) [117-120] oder Azide, welche mit derivatisierten Phosphanen unter Ausbildung einer Amidbindung reagieren (Staudinger-Ligation [121, 122], Abbildung 2.8e). Das Azid reagiert dabei mit einem Triarylphosphan zunächst unter Ausbildung eines Aza-Ylides. Befindet sich das Aza-Ylid in Nachbarschaft zu einem Ester oder Thioester, bildet sich dann infolge einer intramolekularen Acyl-Umlagerung und anschließender Hydrolyse eine Amidbindung zwischen den zu verknüpfenden Substanzen aus [123, 124]. Eine besonders hohe Bioorthogonalität weisen außerdem Cycloadditionen auf. Zu den am häufigsten genutzten Cycloadditionen zählt die kupferkatalysierte 1,3-dipolare Cycloaddition von Aziden an Alkine, bei der 1,2,3-Triazole erzeugt werden (Cu(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition, CuAAC; Abbildung 2.8f) [125-128].

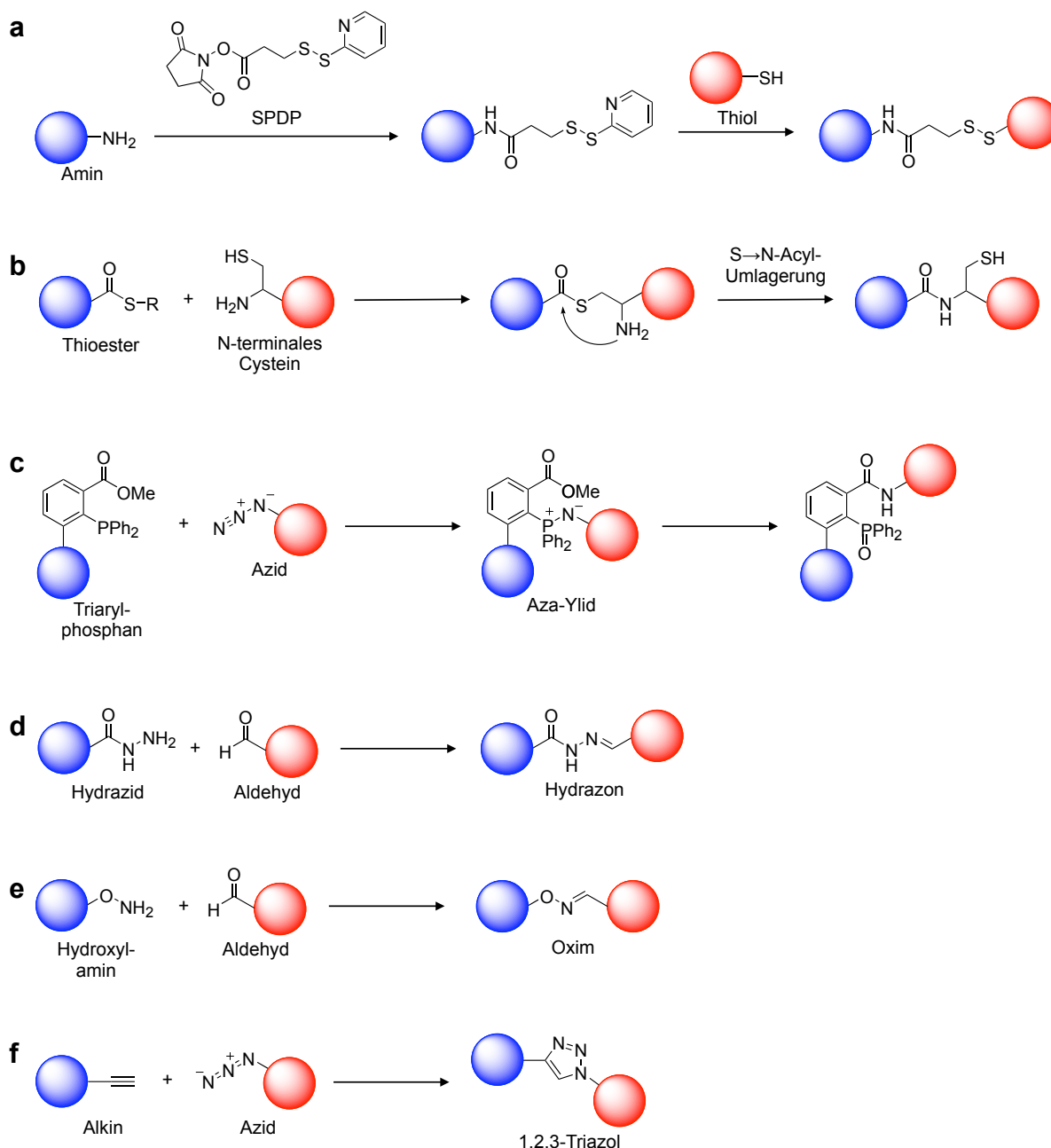


Abbildung 2.8: Übersicht ausgewählter Konjugatsynthesen [88, 101-103]. (a) Konjugation eines Amins und Thiols mit Hilfe des Kopplungsreagenz SPDP. **(b)** NCL: Die Thiolgruppe des Cysteins greift das Carbonyl-C-Atom des Thioesters nukleophil an und es bildet sich ein intermediärer Thioester (Umesterung, reversibel), welcher sich spontan zu einer nativen Peptidbindung umlagert (S→N-Acyl-Umlagerung, irreversibel) **(c)** Staudinger-Ligation: Der C-terminale Phosphino(thio)ester reagiert mit einem N-terminalen Azid zunächst zu einem Aza-Ylid. Die anschließende Acyl-Umlagerung und Hydrolyse ergibt ein Amid. **(d, e)** Iminbildung: Die Kondensationsreaktion von Carbonylverbindungen mit Hydraziden bzw. Hydroxylaminen ergibt ein Hydrazon bzw. Oxim. **(f)** CuAAC: In Anwesenheit von Cu(I) bildet sich in einer 1,3-dipolaren Cycloaddition aus einem Alkin und einem Azid ein 1,2,3-Triazol.

2.3.2. Funktionalisierung von Eisenoxidnanopartikeln mit Biomolekülen

Eisenoxidnanopartikel bestehen in der Regel aus einem Eisenoxidkern mit einer Magnetit- (Fe_3O_4) und / oder Maghemitkristallstruktur ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) [58, 129]. Die Synthese der Partikel erfolgt häufig durch eine Fällungsreaktion von Fe(II) - und Fe(III) -Salzen im wässrigen, basischen Milieu [103, 130]. Der Zusatz von Stabilisatoren verhindert eine Sedimentation oder Aggregation der Partikel und man erhält eine stabile Suspension [103, 130]. Die Stabilisierung erfolgt entweder elektrostatisch durch den Zusatz von z. B. Carbonsäuren oder Phosphaten oder sterisch durch z. B. Polysaccharide oder andere (Bio-)Polymere [103, 130-133]. Tabelle 2.4 gibt eine Übersicht verschiedener in der MRT genutzter Eisenoxidpartikel, welche sich in ihrer Beschichtung sowie dem hydrodynamischen Durchmesser unterscheiden.

Tabelle 2.4: Geeignete Eisenoxidpartikel für die Funktionalisierung und Anwendung in der MRT [58]. VSOP: *very small iron oxide particles*, sehr kleine Eisenoxidpartikel; CLIO: *cross-linked iron oxides*, quervernetzte Eisenoxide.

Eisenoxidpartikel	Beschichtung	hydrodynamischer Durchmesser [nm]
VSOP [13, 17]	Citrat	6-10
CLIO [70, 134]	quervernetztes Dextran	50
Resovist® [135]	Carboxydextran	60
Sinerem® [136]	Dextran	15-30
Endorem® / Feridex® [137, 138]	Dextran	120-180

Die Funktionalisierung von Partikeln kann generell auf vier verschiedenen Wegen erreicht werden, welche sich auf Eisenoxidnanopartikel übertragen lassen (Abbildung 2.9) [102, 103, 139]:

- (1) Direkte Bindung der Moleküle auf der nativen Oberfläche der Partikelkerne.
- (2) Affinitätsbindung der Moleküle über z. B. Protein-Ligand-Wechselwirkungen.
- (3) Elektrostatische Bindung der Moleküle an der geladenen Partikelhülle.
- (4) Kovalente Bindung der Moleküle an der Partikelhülle.

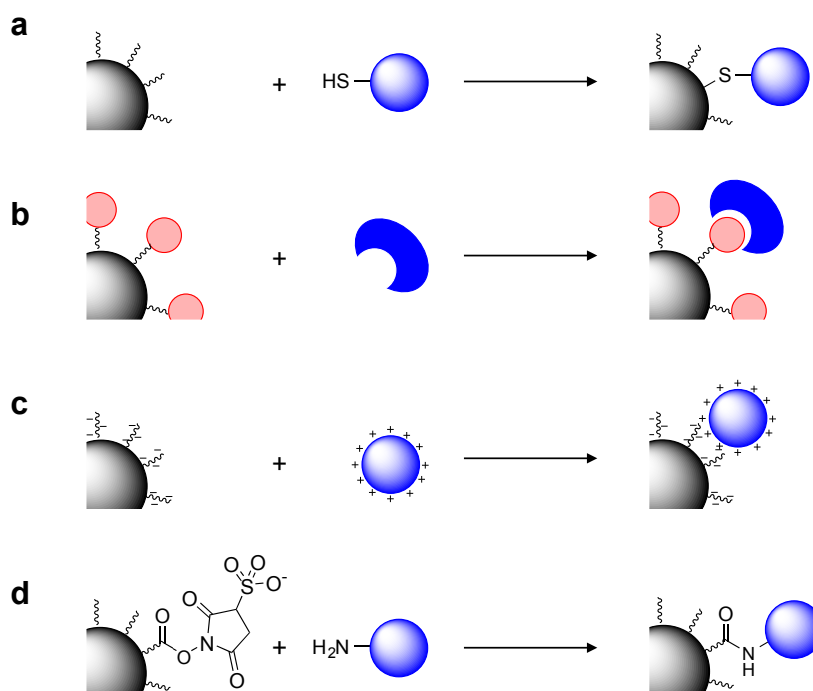


Abbildung 2.9: Strategien zur Funktionalisierung von Nanopartikeln [139]. (a) Direkte Bindung am Partikelkern. (b) Affinitätsbindung z. B. eines Antikörpers an dem auf der Oberfläche gebundenen Liganden. (c) Elektrostatische Bindung an der geladenen Partikeloberfläche. (d) Kovalente Bindung an funktionellen Gruppen der Partikeloberfläche.

Die direkte Konjugation der Moleküle an der nativen Oberfläche der Eisenoxidpartikel erfolgt häufig durch einen Austausch des anzubindenden Moleküls mit den Stabilisatorsubstanzen (Abbildung 2.9a) [103, 140]. Die Moleküle verfügen hierbei über funktionelle Reste mit hoher Affinität zur Oxidoberfläche. Als funktionelle Reste eignen sich im Falle von Eisenoxiden Phosphate, Sulfon- oder Carbonsäuren (z. B. Citronensäure) [130]. Ein anderer Ansatz ist die direkte Anbindung der Moleküle an die frisch ausgefällten nativen Eisenoxidpartikel ebenfalls über funktionelle Seitenreste mit hoher Affinität zur Oxidoberfläche [103, 141, 142]. Befindet sich auf der Partikeloberfläche ein Ligand oder Cofaktor, der vom Biomolekül erkannt wird, kann dieses auch über eine Affinitätsbindung gebunden werden (Abbildung 2.9b) [103, 139]. Zu den bekanntesten Beispielen gehört die Affinitätsbindung zwischen Streptavidin und Biotin [143-145]. Alternativ eignen sich auch Antikörper oder Aptamere für Affinitätsbindungen [103, 139].

Ausgehend von der stabilisierenden Hülle der Eisenoxidkerne verfügen die Partikel über verschiedene funktionelle Gruppen, welche für die elektrostatische oder kovalente Anbindung der Moleküle genutzt werden können (Abbildung 2.9c, d). Zu den häufig genutzten zählen Amino- und Thiolgruppen sowie Hydroxy-, Carboxy- und Carbonylgruppen. VSOP besitzen z. B. eine Citrathülle und sind somit sowohl für eine elektrostatische als auch eine kovalente Beschichtung geeignet [61, 146]. Durch die oben beschriebene Konjugation von Annexin A5

an das polykationische Protamin wurde ein positiv geladener Peptidanker eingeführt, welcher für die elektrostatische Bindung des Annexin A5 an die negativ geladene Citrathülle der VSOP genutzt wurde [17]. Die kovalente Anbindung von Biomolekülen an Carbonsäuren wird z. B. durch 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) erreicht [147-149]. Dafür reagieren die Carbonsäuren mit EDC und es entsteht ein O-Acylisoharnstoff. Um eine Partikelaggregation infolge der Ausbildung des O-Acylisoharnstoffes und des damit verbundenen Ladungsverlusts zu verhindern, kann *N*-Hydroxysulfosuccinimid (Sulfo-NHS) zugesetzt werden [88, 102]. Sulfo-NHS reagiert mit dem O-Acylisoharnstoff zu einem Succinimidylester, wobei die negative Ladung auf der Partikeloberfläche durch die Sulfonsäure erhalten bleibt und die Partikel in Suspension bleiben. Der Succinimidylester kann im Folgeschritt mit der Aminogruppe des Biomoleküls reagieren [88]. CLIO-Partikel (*cross-linked iron oxide*) sind im Gegensatz zu VSOP sterisch stabilisiert [78]. Sie verfügen über eine quervernetzte Dextranhülle und tragen primäre Aminogruppen. Diese wurden erfolgreich für die kovalente Anbindung von Annexin A5 genutzt [70]. Zunächst wurden die Amine mit dem Kopplungsreagenz SPDP umgesetzt, wodurch die Partikel eine Thiolreaktivität erhielten. Durch die Reaktion der Aminogruppen des Annexin A5 mit dem Reagenz *N*-Succinimidyl-S-acetylthioacetat (SATA) wurden im Protein wiederum Thiolgruppen eingeführt. Die Reaktion der SPDP-aktivierten CLIO-Partikel mit SATA-modifiziertem Annexin A5 erzielte dann AnnexinA5-beschichtete CLIO (AnnexinA5-CLIO) (Abbildung 2.8a).

Sofern die Partikeloberfläche die nötigen funktionellen Gruppen aufweist oder diese aufgebracht werden können, lassen sich grundsätzlich auch die in Kapitel 2.3.1. (Synthese von Biokonjugaten) beschriebenen Reaktionen übertragen und für die kovalente Anbindung der Moleküle auf Nanopartikeln genutzt werden [102, 103].

3. ZIELSTELLUNG

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Analyse neuer Bildgebungssonden für die spezifische *in-vivo*-Bildgebung biologischer Prozesse, insbesondere der Apoptose und von Enzymaktivitäten mittels MRT auf der Grundlage superparamagnetischer Eisenoxidnanopartikel. Als superparamagnetische Eisenoxidnanopartikel kamen dafür *very small iron oxide particles* (VSOP) zum Einsatz. Diese sind aufgrund ihrer negativ geladenen Citrathülle elektrostatisch stabilisiert. Für die Apoptose-Bildgebung sollte durch Bindung von Annexin A5 an die VSOP eine zielgerichtete Sonde hergestellt werden (AnxA5-VSOP). Für die Bildgebung von Enzymaktivitäten sollte eine durch die Protease MMP-9 aktivierbare Sonde hergestellt werden (Protease-spezifische Eisenoxidpartikel, PSOP). Abbildung 3.1 gibt modellhaft die eingesetzten VSOP und die daraus hergestellten AnxA5-VSOP und PSOP wieder. Beide hergestellten Sonden sollten letztlich hinsichtlich ihrer Eignung als molekulare Bildgebungssonden untersucht und beurteilt werden.

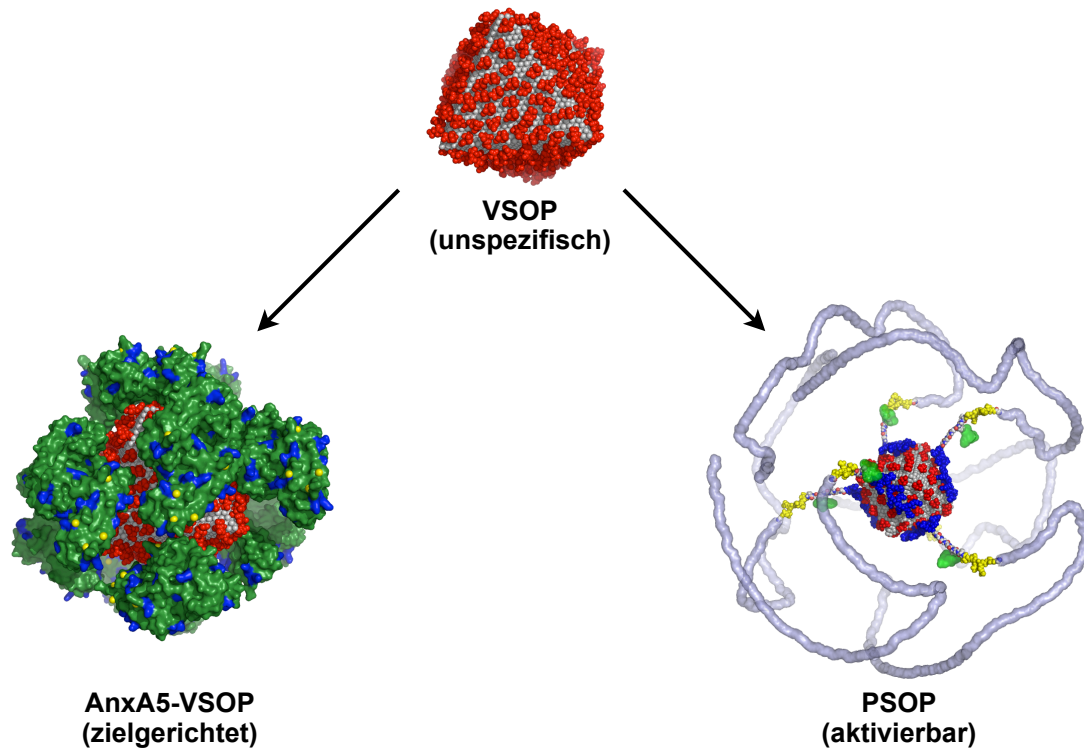


Abbildung 3.1: Modellhafte Darstellung von MRT-Bildgebungssonden auf Basis von VSOP für die Apoptose-Bildgebung (AnxA5-VSOP) sowie die Bildgebung von Enzymaktivitäten (PSOP).

Die **VSOP** (oben) sind durch ihre Citrathülle (rot) elektrostatisch stabilisiert. Die **AnxA5-VSOP** (links) sind zielgerichtete Bildgebungssonden und binden über das gekoppelte Annexin A5 (grün) spezifisch an apoptotische Zellen. Die **PSOP** (rechts) sind aktivierbare Bildgebungssonden. Die PSOP sind sterisch durch eine PEG-Hülle (hellblau) stabilisiert und tragen eine Schnittstelle (gelb) für das gewählte Enzym MMP-9. Infolge der enzymatischen Spaltung, verlieren die PSOP ihre PEG-Hülle und aggregieren.

Die Synthese der AnnexinA5-beschichteten VSOP basierte auf Vorarbeiten bei denen Annexin A5 über ein polykationisches Peptid (Protamin) elektrostatisch an die VSOP gebunden wurde [17]. Im Rahmen dieser Arbeit sollten, ausgehend von den früheren Ergebnissen, AnnexinA5-beschichtete VSOP mit einer höheren Abdeckung der Citrathülle hergestellt werden. Die vollständige Bedeckung durch Annexin A5 sollte gewährleisten, dass unspezifische Bindungen, bspw. hervorgerufen durch die negativ geladene Citrathülle der VSOP, vermindert werden. Neben der physikalischen Charakterisierung der AnnexinA5-beschichteten VSOP (hydrodynamischer Durchmesser, Relaxivität, Menge an gebundenem Protein pro VSOP) mittels Größen- und Relaxivitätsmessungen sowie nativer Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE), sollten die Partikel hinsichtlich ihrer Stabilität unter physiologischen Bedingungen (Größen- und Relaxivitätsmessungen in unterschiedlichen Medien) untersucht werden. Ferner sollten die Partikel mittels MRT-Messungen, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, hinsichtlich ihrer spezifischen Bindung an apoptotische Zellen getestet werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Synthese von PSOP, welche über eine hohe Stabilität unter physiologischen Bedingungen verfügen und gleichzeitig enzymatisch aktivierbar sein

sollten. Die Synthese basierte auf der Anbindung eines Peptid-PEG-Konjugats an die Citrathülle der VSOP. Das dafür eingesetzte Peptid verfügte über eine polykationische Aminosäuresequenz sowie über eine Schnittstelle für die MMP-9. Es sollten zunächst verschiedene Peptid-PEG-Konjugate synthetisiert und mittels Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) und Natriumdodecylsulfat-PAGE (SDS-PAGE) charakterisiert werden. Die verschiedenen Konjugate unterschieden sich in ihrer Aminosäuresequenz (argininreich vs. lysinreich) und in der Anzahl der PEG-Kopplungsstellen für einen Vergleich hinsichtlich der Stabilität der daraus hergestellten PSOP unter physiologischen Bedingungen. Zudem verfügten alle Peptide über den Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein, anhand dessen die Konjugate sowie die hergestellten PSOP zusätzlich charakterisiert werden sollten. Die Synthese der PSOP sollte anschließend durch die Bindung der Peptid-PEG-Konjugate an die Citrathülle der VSOP erfolgen. Die hergestellten PSOP sollten betreffs ihrer Stabilität unter physiologischen Bedingungen und der enzymatischen Aktivierbarkeit mittels Größen- und Fluoreszenzmessungen in unterschiedlichen Medien charakterisiert und bezüglich ihrer Eignung als molekulare Bildgebungssonden bewertet werden.

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1. AnxA5-beschichtete VSOP

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Ansätze zur Beschichtung von VSOP mit Annexin A5 untersucht. In beiden Fällen kam Cys-Annexin A5 (AnxA5) anstelle des Wild-typs Annexin A5 zum Einsatz. Dieses unterschied sich nicht in den Bindungseigenschaften, verfügte aber aufgrund von Punktmutationen über eine frei zugängliche Cysteinseitenkette (Gln-2 > Cys, Cys-315 > Ser), welche zur Modifizierung des Proteins ohne Aktivitätsverlust genutzt werden konnte [66].

Bei der ersten Variante wurde AnxA5 an ein polykationisches Peptid gebunden, welches dann über elektrostatische Wechselwirkung an die negativ geladene Citrathülle der VSOP bindet (**AnxA5-Peptid-VSOP**). In Vorarbeiten wurde dieser Ansatz mit Protamin als polykationisches Peptid bereits verfolgt (AnxA5-Protamin-VSOP) [17] und sollte in der vorliegenden Arbeit weiter ausgearbeitet werden. Protamin ist ein natürlich vorkommendes Peptid mit einer Größe von ungefähr 4 kDa und weist einen hohen Argininanteil auf, wodurch es seinen stark polykationischen Charakter erhält [150, 151]. Es wird in der Klinik als Heparin-Antidot (Medikament zur Antikoagulation) angewandt und erleichtert aufgrund seines polykationischen Charakters auch die Zellaufnahme von Partikeln oder Wirkstoffen [151-153]. Es zeigte sich in den Arbeiten jedoch, dass auch die Kontrollsonde (M1234-Protamin-VSOP) teilweise an apoptotische Zellen gebunden hat. Cys-M1234 (M1234) ist eine inaktive AnnexinA5-Vari-

ante und weist neben den oben beschriebenen Mutationen zusätzlich Punktmutationen in den calciumbindenden Domänen auf (Glu-72 > Gln (M1), Asp-144 > Asn (M2), Glu-288 > Ala (M3), Asp-303 > Asn (M4)), wodurch es nicht mehr an Phosphatidylserin bindet [154]. Die Bindung der M1234-Protamin-VSOP an apoptotische Zellen war demnach unspezifisch und wurde möglicherweise durch eine nicht vollständig abgedeckte Oberfläche und somit freiliegendes Protamin verursacht. Protamin wurde anfänglich am N-Terminus mit dem Kopplungsreagenz SPDP aktiviert, so dass am N-Terminus eine thiolreaktive Gruppe eingebracht wurde, welche wiederum mit AnxA5 reagierte. Für eine vollständigere Abdeckung der Partikel wurde versucht, Protamin zu modifizieren, um letztlich sowohl am N-Terminus als auch am C-Terminus AnxA5 zu koppeln. Die Arbeit mit Protamin erwies sich jedoch als schwierig und wurde letztlich nicht weiter verfolgt. Dies war zum einen dadurch bedingt, dass Protamin als Gemisch aus vier ähnlichen Peptidsequenzen vorliegt [150, 155]. Mit jedem Schritt würde sich dabei die Anzahl der Reaktionspartner erhöhen und folglich die Analytik erschweren. Der weitaus kritischere Punkt war jedoch die natürliche Zersetzung dieser Peptide. Es konnte nicht gewährleistet werden, dass die ursprünglich vorkommenden Peptide intakt blieben, so dass nicht immer von einem vergleichbarem Edukt ausgegangen werden konnte. Die elektrostatische Beschichtung der VSOP mit einem polykationischen Peptid wurde daher soweit umgestellt, als dass ein synthetisch hergestelltes Peptid mit definierter Aminosäuresequenz zum Einsatz kam. Für das Peptid wurde eine Sequenz gewählt, welche zwei primäre Aminogruppen für die Reaktion mit einem Kopplungsreagenz aufwies, um mit einem Peptid zwei AnxA5-Moleküle auf der Partikeloberfläche zu binden und so die Citrathülle sowie das polykationische Peptid besser abzuschirmen.

Bei der zweiten Variante wurde AnxA5 direkt über die vorhandenen primären Aminogruppen kovalent an die Citrathülle der VSOP gebunden (**AnxA5-VSOP**). Es wurde dabei auf Kopplungsreagenzien wie SPDP oder ein positiv geladenes Kopplungspeptid verzichtet, welche unspezifische Wechselwirkungen oder eine Immunantwort hervorrufen könnten. Lediglich die Reagenzien EDC und Sulfo-NHS wurden zur Aktivierung der Citrathülle eingesetzt, so dass bei der Bindung des AnxA5 mit der Citrathülle eine reine Peptidbindung entsteht. Neben der verminderten unspezifischen Bindung durch den Verzicht von Kopplungsreagenzien, wurde sich außerdem eine höhere Ausbeute mit geringeren Verlusten der Reaktionspartner erhofft. Die teilweise sterisch inaktivierten AnxA5, durch die nicht zielgerichtete Kopplung, sollten durch eine hohe Belegungsdichte auf der Oberfläche kompensiert werden.

4.1.1. AnxA5-Peptid-VSOP

4.1.1.1. Synthese der AnxA5-Peptid-AnxA5-Konjugate

Die Konjugation des polykationischen Peptids mit AnxA5 erfolgte über die heterobifunktionalen Kopplungsreagenzien SPDP bzw. Sulfo-SMCC (Abbildung 4.1), welche jeweils über eine amin- und eine thiolreaktive Kopplungsstelle verfügten [88, 106, 156, 157]. Als polykationisches Peptid diente ein argininreiches Peptid (P1) bestehend aus 26 Aminosäuren, welches am C-Terminus eine Amidgruppe aufwies (Abbildung 4.2). Als Kopplungsstellen für die Konjugation mit AnxA5 wurden der N-Terminus sowie die Lysinseitenkette am C-Terminus genutzt. Die in Position 13 befindliche Aminosäure Lysin trug als Modifikation den Farbstoff Fluorescein. Das eingesetzte Peptid P1 hatte eine molare Masse von $M = 3984$ g/mol. Die erhaltenen molaren Massen der aktivierten Peptide und die verschiedenen hergestellten Konjugate sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

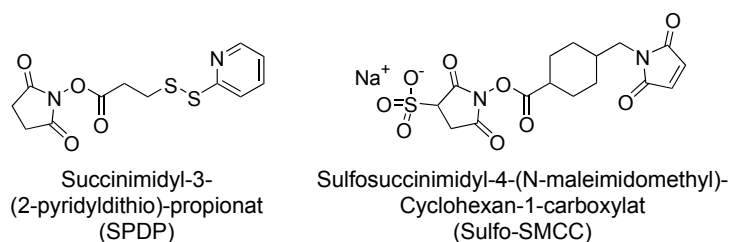


Abbildung 4.1: Verwendete heterobifunktionale Kopplungsreagenzien. SPDP (links) und Sulfo-SMCC (rechts) trugen als aminreaktive Gruppe einen Succinimidester. SPDP verfügte mittels der Disulfidbrücke über eine thiolreaktive Gruppe, während beim Sulfo-SMCC die Konjugation mit dem Thiol über die Maleimidgruppe erfolgte [88].

GRRRR RGRRR RRK(Fluo)RR RRRGR RRRRG K

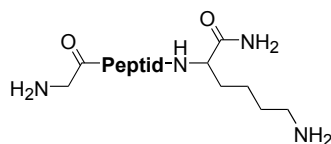


Abbildung 4.2: Eingesetztes polykationisches Peptid P1 zur Herstellung von AnxA5-Peptid-AnxA5-Konjugaten. Die obige Darstellung gibt die Aminosäuresequenz im Einbuchstabencode wieder. Die Konjugation erfolgte über das Glycin am N-Terminus sowie die Lysinseitenkette am C-Terminus (jeweils rot markiert). Die untere Darstellung stellt das vereinfachte Peptid P1 mit den reaktiven Seitenketten dar. Am C-Terminus wies das Peptid eine Amidgruppe auf. Die molare Masse des Peptids betrug 3984 g/mol. Fluo: Fluorescein.

Tabelle 4.1: Hergestellte Konjugate ausgehend von Peptid P1 und den Kopplungsreagenzien SPDP bzw. Sulfo-SMCC.

Kopplungsreagenz	aktiviertes Peptid	AnxA5-Konjugat
SPDP	SPDP-P1-SPDP (K1.1a)	AnxA5-K1.1a-AnxA5 (K1.2a)
	4378 g/mol	76 kDa
	P1-SPDP (K1.1b)	K1.1b-AnxA5 (K1.2b)
	4181 g/mol	40 kDa
Sulfo-SMCC	SMCC-P1-SMCC (K1.3a)	AnxA5-K1.3a-AnxA5 (K1.4a)
	4424 g/mol	76 kDa
	P1-SMCC (K1.3b)	K1.3ba-AnxA5 (K1.4b)
	4204 g/mol	40 kDa

Die Synthese und Charakterisierung der Konjugate AnxA5-K1.1a-AnxA5 (K1.2a) und AnxA5-K1.3a-AnxA5 (K1.4a) verlief analog und ist im Folgenden zusammengefasst. Die jeweiligen Synthesebedingungen ausgehend von den unterschiedlichen Kopplungsreagenzien sind in Abbildung 4.3 aufgeführt.

- (1) Aktivierung des Peptids P1 mit dem Kopplungsreagenz SPDP (Abbildung 4.3a) bzw. Sulfo-SMCC (Abbildung 4.3c).
- (2) Charakterisierung des aktivierten Peptids SPDP-P1-SPDP (K1.1a) bzw. SMCC-P1-SMCC (K1.3a) über HPLC und MALDI/TOF-Massenspektrometrie (MALDI/TOF-MS).
- (3) Reinigung des aktivierten Peptids über Größenausschlusschromatographie zur Abtrennung von unreaktiertem oder überschüssigem Kopplungsreagenz (Zuordnung der gesuchten Fraktionen über Fluorescein-Markierung des Peptids).
- (4) Untersuchung der erfolgreichen Abtrennung von SPDP bzw. Sulfo-SMCC über HPLC (Anhang, Abbildung A.1 (Abtrennung von SPDP), Abbildung A.2 (Abtrennung von Sulfo-SMCC)).
- (5) Behandlung von AnxA5 mit Dithiothreitol (DTT) zur Spaltung möglicher Dimere und anschließende Dialyse zur Abtrennung von DTT.
- (6) Umsetzung des gereinigten aktivierten Peptids mit AnxA5 zum Konjugat AnxA5-K1.1a-AnxA5 (K1.2a) (Abbildung 4.3b) bzw. AnxA5-K1.3a-AnxA5 (K1.4a) (Abbildung 4.3d).
- (7) Untersuchung des Syntheseerfolges und Charakterisierung des Konjugats AnxA5-K1.1a-AnxA5 (K1.2a) bzw. AnxA5-K1.3a-AnxA5 (K1.4a) mittels SDS-PAGE.

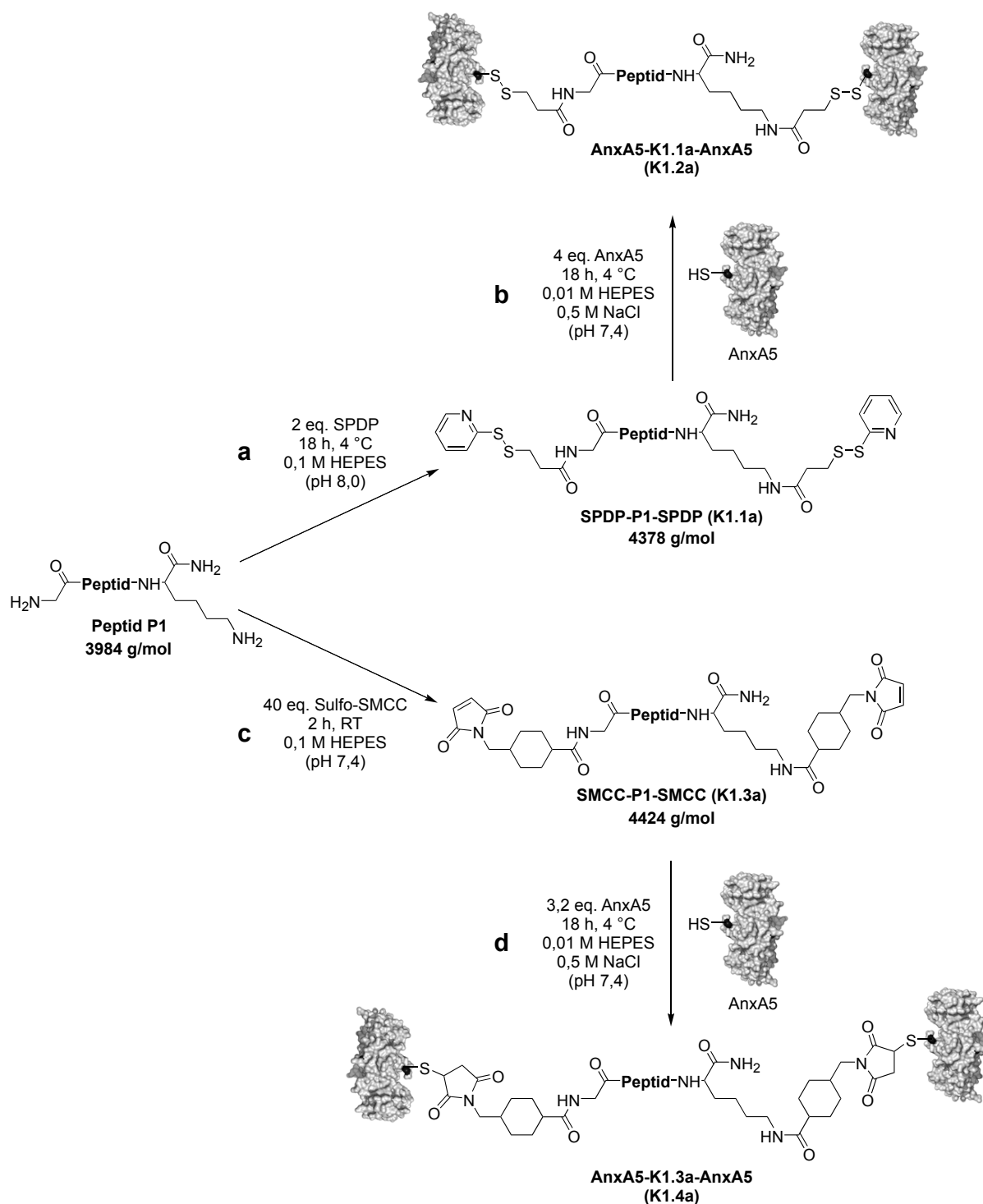


Abbildung 4.3: Synthese von AnxA5-Peptid-AnxA5-Konjugaten mittels SPDP und Sulfo-SMCC.

Die primären Aminogruppen des Peptids P1 reagierten mit dem Succinimidylester des Kopplungsreagenz unter Abspaltung von NHS (a) bzw. Sulfo-NHS (c). Im Folgeschritt reagierte die freie Thiolgruppe des AnxA5 mit dem aktivierten Peptid SPDP-P1-SPDP (K1.1a) unter Abspaltung von Pyridin-2-thion zum Konjugat AnxA5-K1.1a-AnxA5 (K1.2a) (b) bzw. mit der Maleimidgruppe des aktivierten Peptids SMCC-P1-SMCC (K1.3a) zum Konjugat AnxA5-K1.3a-AnxA5 (K1.4a) unter Ausbildung einer Thioetherbindung (d).

AnxA5-K1.1a-AnxA5 (K1.2a)

Das Peptid P1 wurde mit dem zweifachen molaren Überschuss an SPDP aktiviert. Die Reaktion erfolgte über 18 Stunden bei 4 °C in einem HEPES-Puffer (pH 8,0) (Abbildung 4.3a). Aus dem HPLC-Chromatogramm ist ersichtlich, dass sich bei der Umsetzung von P1 mit SPDP ein Reaktionsgemisch bildete (Abbildung 4.4). Nach der Reaktionszeit waren noch 5 % des freien Peptids P1 im Ansatz enthalten, während 95 % umgesetzt wurden. Das Peptid P1 hatte eine Retentionszeit von $t_{\text{Ret}}(\text{P1}) = 5,4$ min und das Reaktionsprodukt von $t_{\text{Ret}}(\text{K1.1a}) = 6,4$ min. Für das Reaktionsprodukt wurde mittels MALDI/TOF-Massenspektrometrie (MALDI/TOF-MS) eine Masse von 4378 m/z ermittelt, welche mit der berechneten Masse des aktivierten Peptids SPDP-P1-SPDP (K1.1a) übereinstimmt (Abbildung 4.5). Neben dem gesuchten Massenpeak war bei 4270 m/z ein weiterer deutlicher Massenpeak zu sehen, wodurch die Bildung eines Nebenproduktes zusätzlich belegt wird. Ein mögliches Produkt, dessen Masse mit der gefundenen Masse übereinstimmt, ist ein beidseitig aktiviertes Peptid, bei dem eine der Disulfidbindungen gespalten wurde und somit über eine freie Thiolgruppe verfügt.

Das Größenausschlusschromatogramm zur Abtrennung des nicht umgesetzten SPDP ist in Abbildung 4.6 gezeigt. Das aktivierte Peptid SPDP-P1-SPDP (K1.1a) eluierte mit einer Retentionszeit von $t_{\text{Ret}}(\text{K1.1a}) = 6-7$ min als erstes, gefolgt von SPDP und NHS (entstanden aus der Reaktion des Peptids mit SPDP sowie der Hydrolyse von SPDP). Nach Reaktion des Peptids P1 mit SPDP und der Reinigung betrug die Ausbeute an aktiviertem Peptid 10 %.

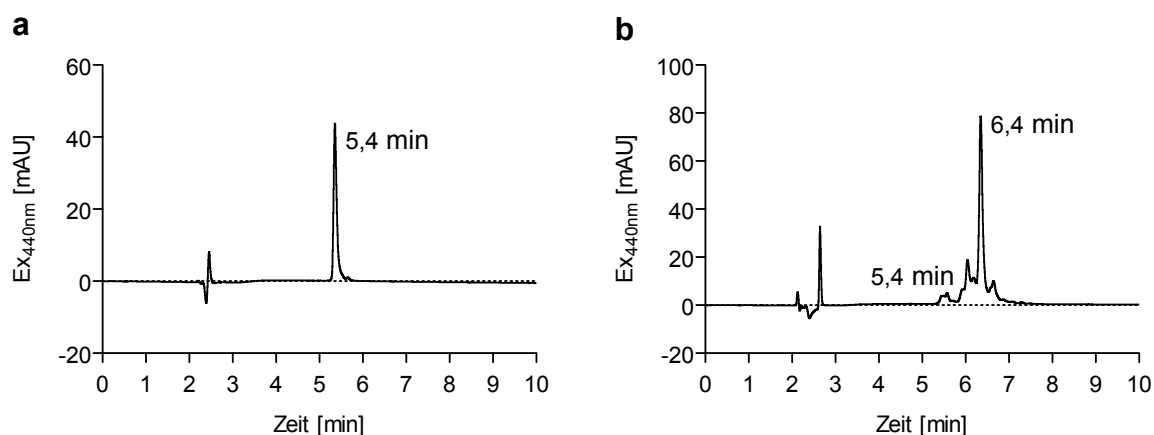


Abbildung 4.4: HPLC-Chromatogramme des eingesetzten Peptids P1 (a) und des Reaktionsansatzes SPDP-P1-SPDP (K1.1a) (b).

(a) $t_{\text{Ret}}(\text{P1}) = 5,4$ min

(b) $t_{\text{Ret}}(\text{K1.1a}) = 6,4$ min. Nach der Reaktionszeit waren 95 % des Peptids P1 umgesetzt.

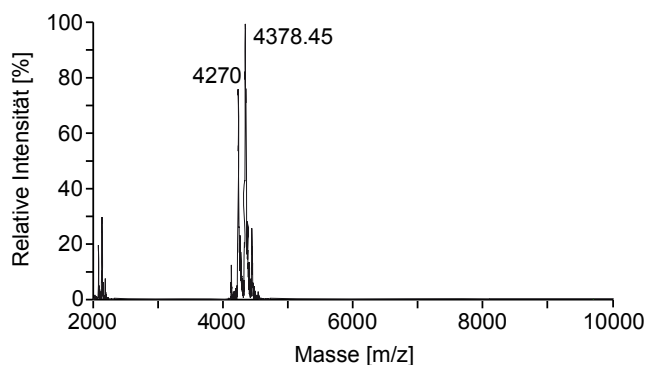


Abbildung 4.5: MALDI/TOF-Massenspektrum des Reaktionsansatzes SPDP-P1-SPDP (K1.1a).

$M_{\text{ber}}(\text{K1.1a}) = 4378 \text{ g/mol}$; $M_{\text{gef}}(\text{K1.1a}) = 4378 \text{ g/mol}$.

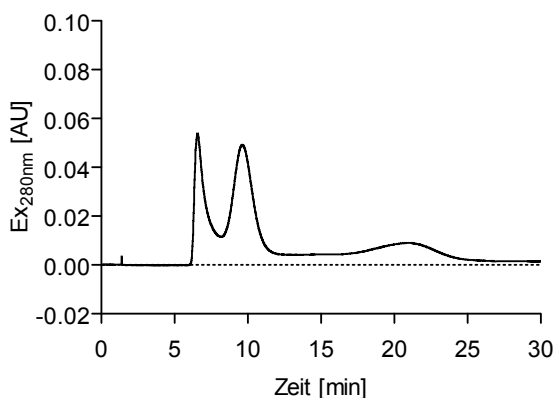


Abbildung 4.6: Größenausschlusschromatogramm der Reinigung des Reaktionsansatzes von SPDP-P1-SPDP (K1.1a).

$t_{\text{Ret}}(\text{K1.1a}) = 6\text{-}7 \text{ min}$; $t_{\text{Ret}}(\text{SPDP}) = 8\text{-}12 \text{ min}$; $t_{\text{Ret}}(\text{SPDP, Hydrolyseprodukte}) = 17\text{-}24 \text{ min}$.

Die Umsetzung des aktivierten Peptids SPDP-P1-SPDP (K1.1a) zum Konjugat AnxA5-K1.1a-AnxA5 (K1.2a) erfolgte mit dem vierfachen molaren Überschuss an AnxA5 über 18 Stunden bei 4 °C in einem NaCl-haltigen HEPES-Puffer (pH 7,4) (Abbildung 4.3b). Nach der Reaktion von AnxA5 mit dem aktivierten Peptid SPDP-P1-SPDP (K1.1a) wurden in der SDS-PAGE vier Banden gefunden (Abbildung 4.7). Der Reaktionsansatz enthielt neben überschüssigem AnxA5 (36 kDa), und daraus gebildeten AnxA5-Dimeren (72 kDa), einfach konjugiertes Peptid (K1.1b-AnxA5, 40 kDa) sowie das zweifach konjugierte Peptid (AnxA5-K1.1a-AnxA5, 76 kDa). Von der eingesetzten Gesamtmenge des AnxA5 wurden 13 % zum gewünschten Konjugat AnxA5-K1.1a-AnxA5 (K1.2a) und 7 % zum Konjugat K1.1b-AnxA5 (K1.2b) umgesetzt. 14 % des eingesetzten AnxA5 dimerisierten während der Reaktion. Unter Berücksichtigung der eingesetzten Menge an AnxA5 (vierfacher molarer Überschuss), ließ sich auf die Umsetzung des Peptids schließen. Von dem aktivierten Peptid wurden somit ca. 26 % zu AnxA5-K1.1a-AnxA5 (K1.2a) und ca. 28 % zu K1.1b-AnxA5 (K1.2b) umgesetzt.

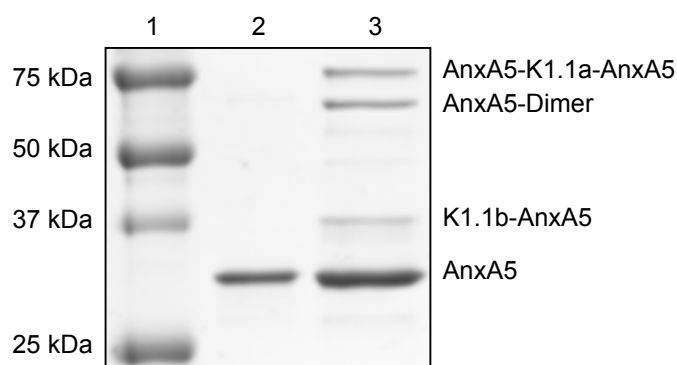


Abbildung 4.7: SDS-PAGE von AnxA5 und AnxA5-K1.1a-AnxA5. (1) Proteingrößenmarker (2) AnxA5 (3) Reaktionsansatz aus AnxA5 (36 kDa), K1.1b-AnxA5 (40 kDa), Anx-Dimer (72 kDa) und AnxA5-K1.1a-AnxA5 (76 kDa).

AnxA5-K1.3a-AnxA5 (K1.4a)

Die Umsetzung des Peptids P1 zum aktivierten Peptid SMCC-P1-SMCC (K1.3a) erfolgte mit einem 40-fachen molaren Überschuss an Sulfo-SMCC über 2 Stunden bei Raumtemperatur (RT) in einem HEPES-Puffer (pH 7,4) (Abbildung 4.3c). Die HPLC-Ergebnisse belegen die vollständige Umsetzung des Peptids sowie die Bildung eines Reaktionsgemisches (Abbildung 4.8). Durch die Reaktion des Peptids P1 mit Sulfo-SMCC verschob sich dessen Retentionszeit von $t_{\text{Ret}}(\text{P1}) = 5,4 \text{ min}$ zu $t_{\text{Ret}}(\text{K1.3a}) = 6,5 \text{ min}$. Die im Massenspektrum gefundene Masse von 4428 m/z wurde dem aktivierten Peptid SMCC-P1-SMCC (K1.3a) (berechnete Masse 4424 m/z) zugeordnet (Abbildung 4.9). Zusätzlich wurde ein deutlicher Massenpeak bei 4528 m/z nachgewiesen, der jedoch keinem zu erwartenden Nebenprodukt zugeordnet werden konnte. Eine mögliche Nebenreaktion der Maleimidgruppe mit den primären Aminogruppen (und z. B. anschließender Hydrolyse des Succinimidylesters oder Verknüpfung der Peptide) erzielt Produkte, dessen Massen von der zweiten gefundenen Masse abweichen.

Die Abtrennung von überschüssigem Sulfo-SMCC über Größenausschlusschromatographie ist in Abbildung 4.10a gezeigt. Das aktivierte Peptid SMCC-P1-SMCC (K1.3a) eluierte bei einer Retentionszeit von $t_{\text{Ret}}(\text{K1.3a}) = 5 \text{ min}$, dicht gefolgt von überschüssigem Sulfo-SMCC. Von der ursprünglich eingesetzten Peptidmenge konnten 7 % zur weiteren Reaktion verwendet werden.

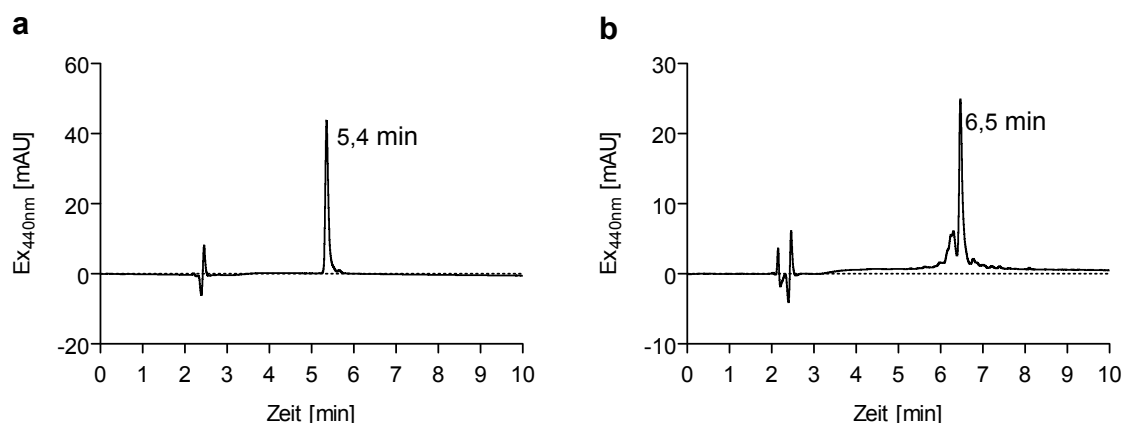


Abbildung 4.8: HPLC-Chromatogramme des eingesetzten Peptids P1 (a) und des Reaktionsansatzes SMCC-P1-SMCC (K1.3a) (b).

(a) $t_{\text{Ret}}(\text{P1}) = 5,4 \text{ min}$ (b) $t_{\text{Ret}}(\text{K1.3a}) = 6,5 \text{ min}$.

(b) Das Peptid P1 wurde vollständig umgesetzt.

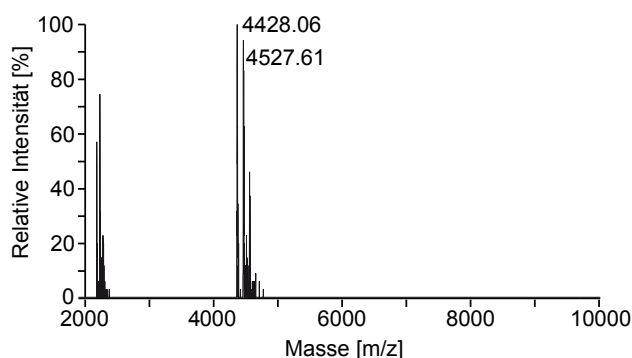


Abbildung 4.9: MALDI/TOF-Massenspektrum des Reaktionsansatzes SMCC-P1-SMCC (K1.3a).

$M_{\text{ber}}(\text{K1.3a}) = 4424 \text{ g/mol}$; $M_{\text{gef}}(\text{K1.3a}) = 4428 \text{ g/mol}$.

Das aktivierte Peptid SMCC-P1-SMCC (K1.3a) wurde mit dem 3,2-fachen molaren Überschuss an AnxA5 zum Konjugat AnxA5-K1.3a-AnxA5 (K1.4a) umgesetzt (Abbildung 4.3d). Die Reaktion erfolgte über 18 Stunden bei 4 °C in einem NaCl-haltigen HEPES-Puffer (pH 7,4) und das erhaltene Konjugat wurde anschließend über Größenausschlusschromatographie (Abbildung 4.10b) gereinigt. Die Ergebnisse der SDS-PAGE zeigen, dass im Reaktionsansatz neben überschüssigem AnxA5 (36 kDa) das daraus gebildete AnxA5-K1.3a-AnxA5 (76 kDa) sowie K1.3b-AnxA5 (40 kDa) enthalten waren (Abbildung 4.11, Spur 3). Die Korrelation der Ergebnisse der Größenausschlusschromatographie und der SDS-PAGE belegte, dass K1.3b-AnxA5 durch die Größenausschlusschromatographie abgetrennt wurde und im ersten Peak nur AnxA5 und AnxA5-K1.3a-AnxA5 ent-

halten war (Abbildung 4.10b, Peak 1; Abbildung 4.11, Spuren 4-7). Die Auswertung ergab ferner, dass vom eingesetzten AnxA5 32 % zum gewünschten Konjugat AnxA5-K1.3a-AnxA5 und 15 % zum Konjugat K1.3b-AnxA5 reagierten. Unter Berücksichtigung der eingesetzten Menge an AnxA5 (3,2-facher molarer Überschuss), wurde außerdem die umgesetzte Menge des Peptids ermittelt. Das aktivierte Peptid wurde demnach zu 52 % zu AnxA5-K1.3a-AnxA5 (K1.4a) und zu 48 % zu K1.3b-AnxA5 (K1.4b) umgesetzt.

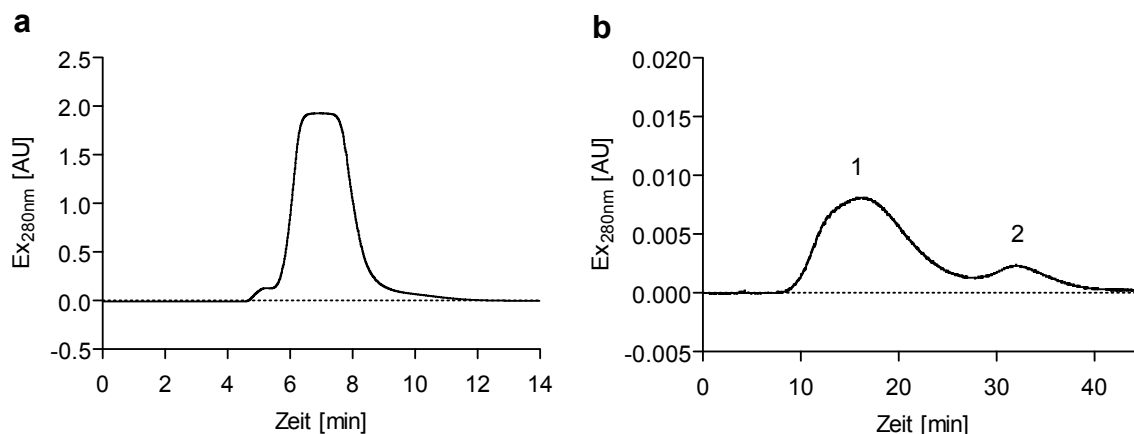


Abbildung 4.10: Größenausschlusschromatogramm der Reinigung des Reaktionsansatzes von SMCC-P1-SMCC (K1.3a) (a) und AnxA5-K1.3a-AnxA5 (K1.4a) (b).

(a) $t_{\text{Ret}}(\text{K1.3a}) = 5 \text{ min}$; $t_{\text{Ret}}(\text{Sulfo-SMCC}) = 6-9 \text{ min}$.

(b) $t_{\text{Ret}}(\text{K1.4a}) = 10-25 \text{ min}$. Die Korrelation mit den Ergebnissen der SDS-PAGE ergab, dass AnxA5 und AnxA5-K1.3a-AnxA5 (K1.4a) gemeinsam eluierten (Peak 1).

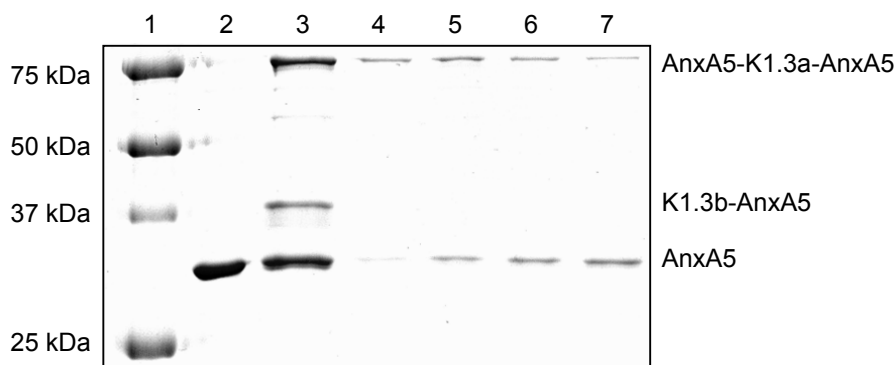


Abbildung 4.11: SDS-PAGE von AnxA5 und AnxA5-K1.3a-AnxA5. (1) Proteingrößenmarker (2) AnxA5 (3) Reaktionsansatz aus AnxA5 (36 kDa), K1.3b-AnxA5 (40 kDa) und AnxA5-K1.3a-AnxA5 (76 kDa) (4-7) ausgewählte gesammelte Fraktionen (aufsteigend) aus der Größenausschlusschromatographie (Peak 1) zur Reinigung des Reaktionsansatzes. Durch die Reinigung konnte das unerwünschte Reaktionsprodukt K1.3b-AnxA5 abgetrennt werden.

4.1.1.2. Elektrostatische Beschichtung von VSOP mit AnxA5-Peptid-AnxA5-Konjugaten

Die elektrostatische Beschichtung der VSOP erfolgte mit dem Konjugat AnxA5-K1.3a-AnxA5 und wurde durch Zugabe der VSOP-Suspension zur Konjugatlösung erreicht. Es wurde lediglich das Konjugat AnxA5-K1.3a-AnxA5 (K1.4a) eingesetzt, welches mit Hilfe des Koppelungsreagens Sulfo-SMCC hergestellt wurde, da das weitere Konjugat AnxA5-K1.1a-AnxA5 (K1.2a) in zu geringer Menge vorlag. Aufgrund der niedrigen Ausbeuten und des hohen Verbrauchs des kostenintensiven AnxA5, wurde auf eine erneute Synthese des Konjugats AnxA5-K1.1a-AnxA5 (K1.2a) verzichtet.

Der eingesetzte Überschuss an AnxA5-K1.3a-AnxA5 zu VSOP wurde basierend auf Ergebnissen aus der SDS-PAGE (Abbildung 4.11) und der Proteinkonzentration (Bicinchoninsäure-Proteinnachweis, BCA-Proteinnachweis) abgeschätzt, da in den verwendeten Fraktionen sowohl Konjugat als auch freies AnxA5 enthalten war. Es wurde ein Massenverhältnis von 1:1 von Konjugat zu Monomer angenommen. Basierend auf Daten der VSOP erhalten aus der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) (durchgeführt von Herrn Sören Selve an der *Technischen Universität Berlin* (Berlin, Deutschland) in der Zentraleinrichtung Elektronenmikroskopie) und der Auswertung mit Hilfe des Programms *CrystalMaker* (unter Annahme eines Magnetitkristalls) wurde ermittelt, dass die hier verwendeten VSOP (VSOP-Charge 081209F4) über ca. 14000 Eisenatome verfügten (siehe Kapitel 6.2. VSOP). Für das Verhältnis von Konjugat AnxA5-K1.3a-AnxA5 (K1.4a) zu VSOP wurde ein Verhältnis von 6:1 unter Berücksichtigung des AnxA5-Anteils gemäß der SDS-PAGE angenommen, was bei vollständiger Beschichtung eine Bindung von zwölf AnxA5 auf der Oberfläche entspräche. Durch die Beschichtung nahm der hydrodynamische Durchmesser der Partikel von 9,5 nm auf 18,7 nm (ungereinigt, Gemisch aus AnxA5-Peptid-VSOP, AnxA5-K1.3a-AnxA5 und AnxA5) bzw. 20,9 nm (gereinigt, AnxA5-Peptid-VSOP) zu (Abbildung 4.12). Die Abtrennung des ungebundenen AnxA5 und AnxA5-K1.3a-AnxA5 von den AnxA5-Peptid-VSOP erfolgte über MACS®-Säulen (*magnetic cell separation*), welche über eine ferromagnetische Matrix als stationäre Phase verfügen. Durch Einspannen der Säule in einen Magneten, wurden die magnetischen Partikel zurückgehalten, während ungebundenes AnxA5, AnxA5-K1.3a-AnxA5 sowie weniger magnetische Partikel eluierten. Im Anschluss wurde die Säule aus dem Magneten entfernt und die zurückgehaltenen AnxA5-Peptid-VSOP eluierten durch Spülen mit Puffer. Die Konzentration und die erhaltenen Ausbeuten der hergestellten AnxA5-Peptid-VSOP waren letztlich so gering, dass keine weiteren Untersuchungen mit den erhaltenen Partikeln durchgeführt wurden.

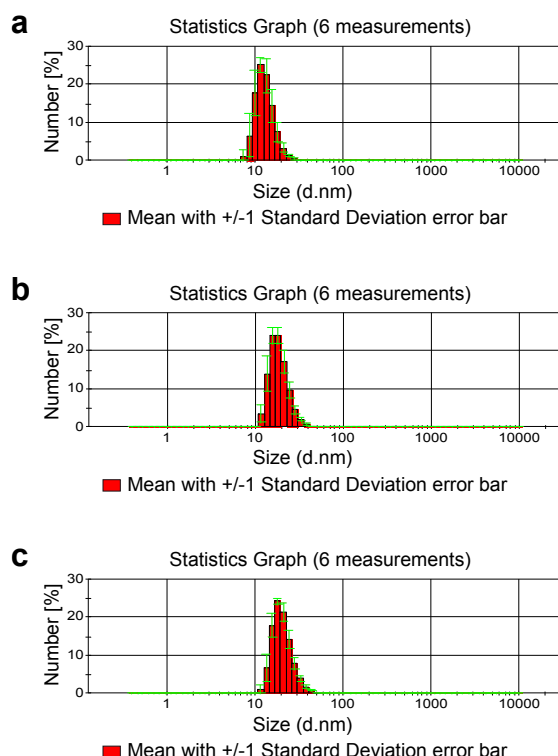


Abbildung 4.12: Größenverteilung der eingesetzten VSOP (a) sowie der ungereinigten (b) und der gereinigten (c) AnxA5-Peptid-VSOP. Die unbeschichteten VSOP hatten einen hydrodynamischen Durchmesser von $9,5 \pm 0,4$ nm. Durch das Beschichten stieg der hydrodynamische Durchmesser auf $18,7 \pm 0,9$ nm (ungereinigte AnxA5-Peptid-VSOP) bzw. $20,9 \pm 1,0$ nm (gereinigte AnxA5-Peptid-VSOP) an.

4.1.2. AnxA5-VSOP

4.1.2.1. Kovalente Bindung von AnxA5 an VSOP-Oberfläche

Die kovalente Anbindung von AnxA5 an die Citrathülle der VSOP erfolgte in zwei Stufen: (1) Aktivierung der VSOP-Oberfläche mit EDC und Sulfo-NHS und (2) Reaktion der aktivierten Oberfläche mit primären Aminogruppen von AnxA5 (Abbildung 4.13) [158, 159]. Beim ersten Schritt reagierten die Carboxygruppen der VSOP mit EDC unter Ausbildung eines O-Acylisoharnstoffes, der wiederum direkt mit Sulfo-NHS reagierte, wobei ein Succinimidylester entstand. Die Reaktion erfolgte über 15 min in einem MES-Puffer (pH 6,0) bei RT. Die anschließende Reinigung der aktivierten VSOP erfolgte über Zentrifugenfilter. Nach Abtrennung von EDC und Sulfo-NHS, wurden die aktivierten VSOP zur AnxA5-Lösung gegeben. Die Reaktion erfolgte in einem NaCl-haltigen HEPES-Puffer (pH 7,4) über 18 Stunden bei 4 °C. Das ungebundene AnxA5 wurde nach der Reaktionszeit über Zentrifugenfilter abgetrennt. Die Synthese der Kontrollsonde M1234-VSOP erfolgte mit der inaktiven AnxA5-Variante Cys-M1234 (M1234) und wurde analog zu der von AnxA5-VSOP durchgeführt.

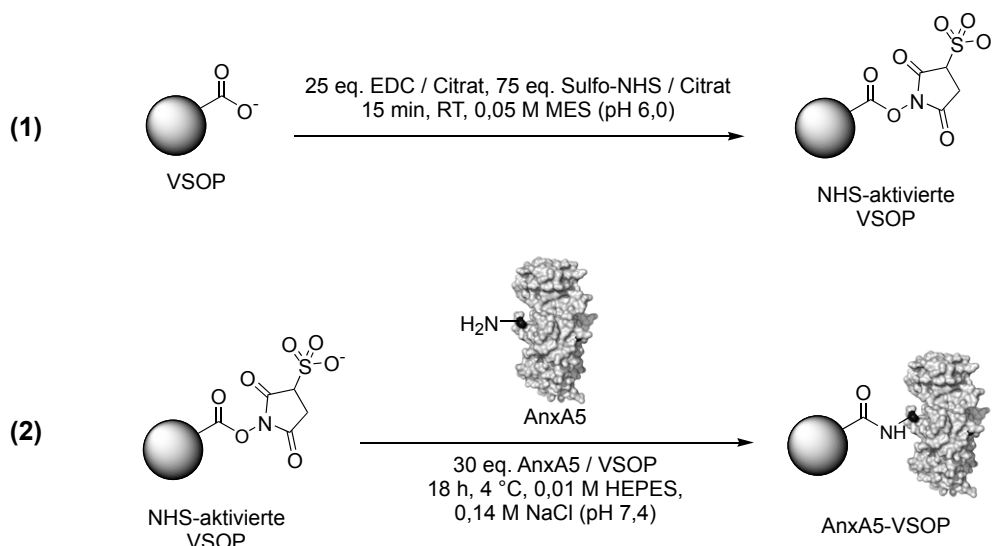


Abbildung 4.13: 2-Stufen-Synthese von AnxA5-VSOP: (1) Reaktion der Citrathülle der VSOP mit EDC und Sulfo-NHS unter Ausbildung eines Succinimidylesters. (2) Reaktion der primären Aminogruppen von AnxA5 mit dem Succinimidylester unter Ausbildung einer Amidbindung zwischen Citrathülle und AnxA5. Die Abbildung ist stark vereinfacht und stellt exemplarisch nur die Reaktion einer einzelnen Aminogruppe mit einem Succinimidylester dar.

Die hier eingesetzten VSOP hatten als unbeschichtete Partikel einen hydrodynamischen Durchmesser von 7,5 nm (Abbildung 4.14a, b). Durch die Aktivierung mit EDC und Sulfo-NHS im ersten Schritt veränderte sich dieser nicht. Die AnxA5-VSOP hatten einen hydrodynamischen Durchmesser von 14,4 nm ($n = 5$, Anzahl der Syntheseansätze) (Abbildung 4.14c, d). Die Beschichtung mit M1234 erzielte Partikel mit einem hydrodynamischen Durchmesser von 12,8 nm ($n = 2$, Anzahl der Syntheseansätze) (Abbildung 4.14e, f). Die Größenmessung mittels dynamischer Lichtstreuung zeigte, dass sowohl nach der Synthese als auch der Reinigung über Zentrifugenfilter keine aggregierten Partikel enthalten waren. Durch die Reinigung über Zentrifugenfilter war der Verlust der eingesetzten VSOP minimal. Das im Überschuss eingesetzte AnxA5 und M1234 konnte dabei außerdem abgetrennt und wiederverwendet werden, wodurch die Kosten für die Synthese stark reduziert wurden. Die Abtrennung von EDC und Sulfo-NHS wurde vor Zugabe von AnxA5 über Messung von Absorptionsspektren der Filtrate kontrolliert (Anhang, Abbildung A.3).

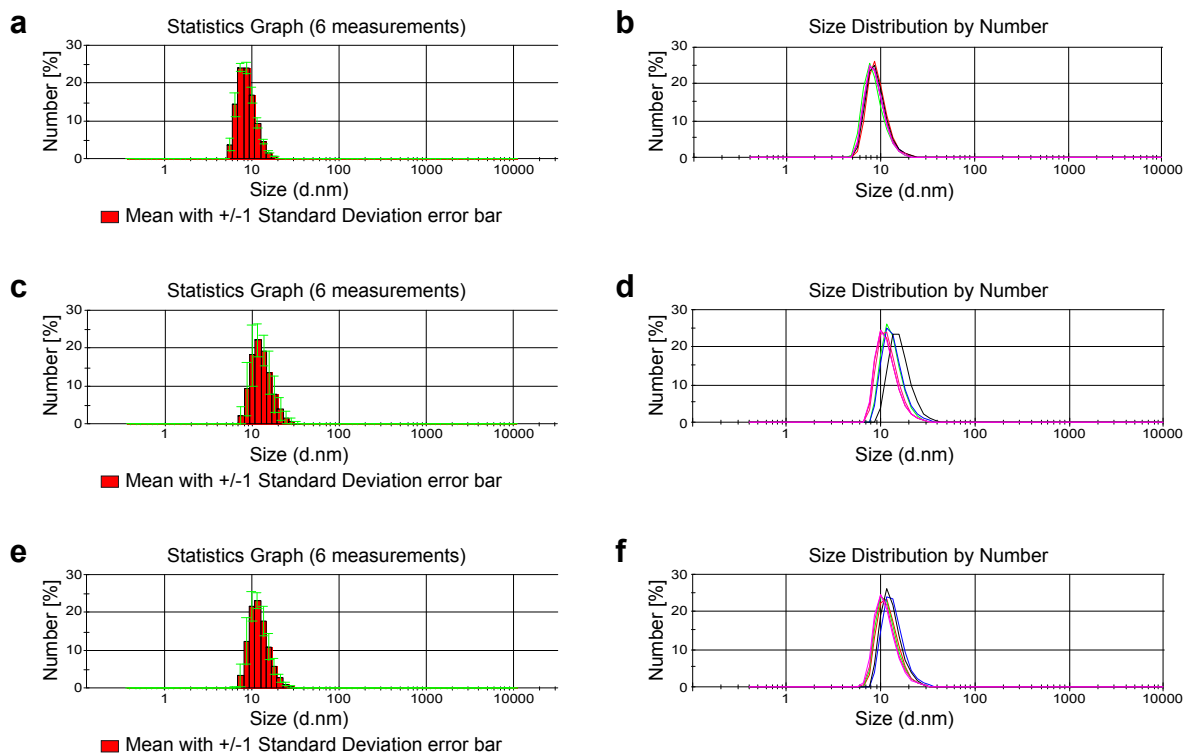


Abbildung 4.14: Exemplarische Größenmessung von VSOP, AnxA5-VSOP und M1234-VSOP mittels dynamischer Lichtstreuung. Die unbeschichteten VSOP hatten einen hydrodynamischen Durchmesser von $7,5 \pm 0,2$ nm (**a, b**), die AnxA5-VSOP von $14,4 \pm 2,3$ nm (**c, d**) und die M1234-VSOP von $12,8 \pm 0,9$ nm (**e, f**). Links ist die Statistik und rechts die jeweiligen Größenverteilungen der einzelnen Messungen dargestellt.

Die Abtrennung von ungebundenem AnxA5 und M1234 wurde über native PAGE überprüft (Abbildung 4.15). Die unverdünnten Proben wurden mit SDS- und Mercaptoethanol-freiem Probenpuffer aufgetragen. Im Falle der ungereinigten Protein-VSOP sieht man deutlich, dass sich ungebundenes AnxA5 bzw. M1234 durch das Gel bewegte, während die beschichteten VSOP in der Tasche verblieben (Abbildung 4.15, Spur 2). Da AnxA5 und M1234 im 30-fachen molaren Überschuss zu den VSOP gegeben wurde, war nach der Umsetzung noch ein großer Anteil ungebundenes Protein im Reaktionsansatz enthalten, welches als Monomer beim Größenmarker von 37 kDa (AnxA5) bzw. 50 kDa (M1234) sowie als Dimer zwischen 50 kDa und 75 kDa (AnxA5) bzw. bei 75 kDa (M1234) zu sehen war. Nach der Reinigung der AnxA5-VSOP sah man lediglich eine gefärbte Bande in der Tasche (Abbildung 4.15, Spur 3) und keine Bande bei 37 kDa bzw. 50 kDa für freies Protein, was die erfolgreiche Abtrennung belegt. Zur Kontrolle wurde nach der Reinigung außerdem eine Probe des Filtrats, welches abgetrenntes Protein enthalten sollte, entnommen und ebenfalls aufgetragen (Abbildung 4.15, Spur 4). Anhand der Bande bei 37 kDa bzw. 50 kDa konnte hier das abgetrennte AnxA5 bzw. M1234 nachgewiesen werden. Aufgrund der Mutationen in den Ca^{2+} -Bindungstaschen besitzt M1234 eine andere Nettoladung als AnxA5. Da unter nativen Bedingungen gearbeitet wurde, wies M1234 somit auch ein anderes Laufverhalten auf. AnxA5

und M1234 waren daher nicht direkt miteinander vergleichbar und die ebenfalls mitgeführten Größenstandards dienten nur als Referenz.

Die erfolgreiche Abtrennung des nicht gebundenen AnxA5 und M2134 ermöglichte die Berechnung der gebundenen Protein-Moleküle pro Partikel durch Messung der Eisen- und Proteinkonzentration. Analog zu den oben beschriebenen VSOP (siehe Kapitel 4.1.1.2. Elektrostatische Beschichtung von VSOP mit AnxA5-Peptid-AnxA5-Konjugaten) wurde für die hier eingesetzten VSOP (VSOP-Charge 190411F3) aus den TEM-Daten und unter Zuhilfenahme des Programms *CrystalMaker* die Anzahl der Eisenatome pro VSOP abgeschätzt und ermittelt, dass diese über ca. 6500 Eisenatome verfügten (siehe Kapitel 6.2. VSOP). Aus den ermittelten Eisen- und Proteinkonzentrationen konnte so ein geschätztes Verhältnis von AnxA5 zu VSOP von 9:1 ermittelt werden. Für die M1234-VSOP wurde mit 8,5:1 aus M1234 zu VSOP ein ähnliches Verhältnis ermittelt.

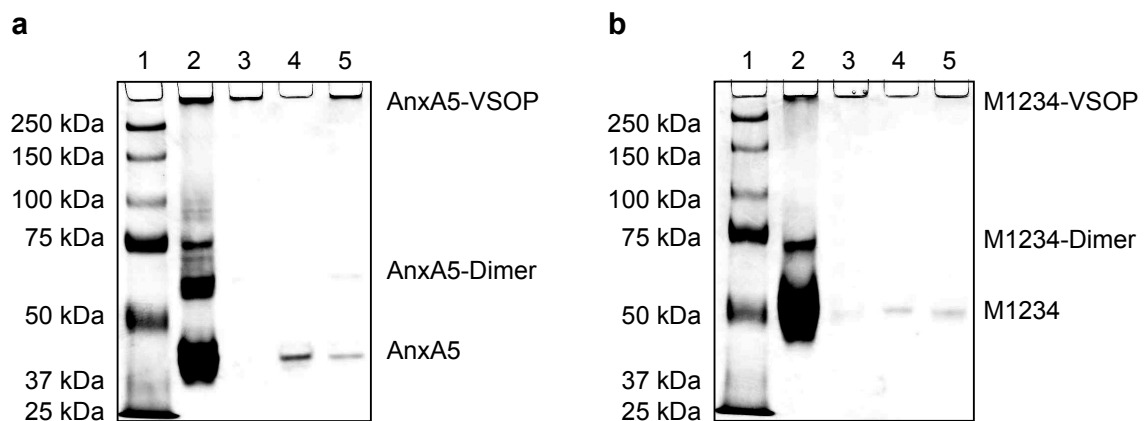


Abbildung 4.15: (a) Native PAGE von Coomassie-gefärbten AnxA5-VSOP- und AnxA5-Proben.

(1) Proteingrößenmarker (2) ungereinigte AnxA5-VSOP ($c_{Fe} = 12,5 \text{ mM}$, $c_{AnxA5} = 2,03 \text{ g/l}$) (3) gereinigte AnxA5-VSOP ($c_{Fe} = 6,1 \text{ mM}$, $c_{AnxA5} = 0,32 \text{ g/l}$) (4) abgetrenntes AnxA5 ($c_{AnxA5} = 0,15 \text{ g/l}$) (5) Gemisch aus gereinigten AnxA5-VSOP ($c_{Fe} = 6,1 \text{ mM}$, $c_{AnxA5} = 0,32 \text{ g/l}$) und abgetrenntem AnxA5 ($c_{AnxA5} = 0,15 \text{ g/l}$) (Verhältnis 1:1).

(b) Native PAGE von Coomassie-gefärbten M1234-VSOP- und M1234-Proben. (1) Proteingrößenmarker (2) ungereinigte M1234-VSOP ($c_{Fe} = 13,3 \text{ mM}$, $c_{M1234} = 2,19 \text{ g/l}$) (3) gereinigte M1234-VSOP ($c_{Fe} = 4,5 \text{ mM}$, $c_{M1234} = 0,22 \text{ g/l}$) (4) abgetrenntes M1234 ($c_{M1234} = 0,04 \text{ g/l}$) (5) Gemisch aus gereinigten M1234-VSOP ($c_{Fe} = 4,5 \text{ mM}$, $c_{M1234} = 0,22 \text{ g/l}$) und abgetrenntem M1234 ($c_{M1234} = 0,04 \text{ g/l}$) (Verhältnis 1:1).

Die beschichteten VSOP blieben in der Geltasche, während ungebundenes AnxA5 und M1234 durch das Gel wanderte.

4.1.2.2. Stabilitätsuntersuchungen der AnxA5-VSOP

Die Größenmessungen der Partikel mittels dynamischer Lichtstreuung zur Untersuchung der Stabilität erfolgte in Wasser und Bindungspuffer mit ansteigenden CaCl_2 -Konzentrationen (Abbildung 4.16a) sowie zeitabhängig in Bindungspuffer mit 1,8 mM CaCl_2 (Abbildung 4.16b). Der Bindungspuffer, welcher auch für die *in-vitro*-Untersuchungen genutzt wurde, enthielt, sofern nicht anders angegeben, neben 10 mM HEPES und 1,8 mM CaCl_2 weitere Salze in physiologischer Konzentration (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl_2). Der Einfluss von Calcium auf die Stabilität der hergestellten Partikel wurde untersucht, da Annexin A5 calciumabhängig an Phosphatidylserin bindet und Citrat eine hohe Affinität zu Calcium aufweist [31, 160]. Die Gesamt-Calciumkonzentration in Serum bzw. im Blut liegt zwischen 2,2 und 2,6 mM, wovon ca. 50 % in freier Form vorliegen und die übrigen 50 % an Proteine gebunden sind [161]. Die Größenmessungen wurden in CaCl_2 -Lösungen mit einem Konzentrationsbereich von 0,7-2,8 mM CaCl_2 durchgeführt, der somit die Ca^{2+} -Konzentration im Blut abdeckt. Es wurden insgesamt fünf verschiedene CaCl_2 -Konzentrationen in Wasser und Bindungspuffer untersucht (Abbildung 4.16a).

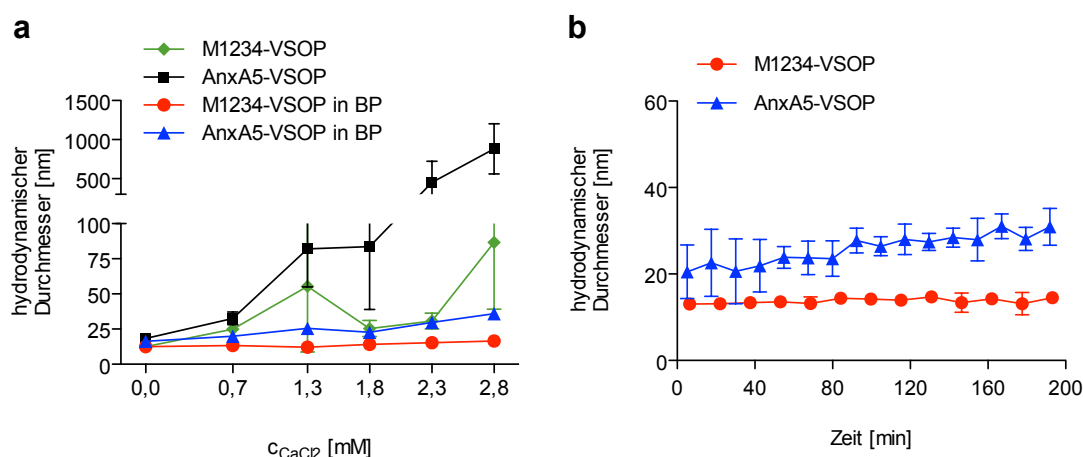


Abbildung 4.16: Untersuchung der Partikelstabilität mittels Größenmessungen von AnxA5-VSOP und M1234-VSOP. Die Partikel wurden in Wasser (grün, schwarz) und in Bindungspuffer (rot, blau) mit ansteigenden CaCl_2 -Konzentrationen (**a**, $n = 6$) und zeitabhängig in Bindungspuffer mit 1,8 mM CaCl_2 (**b**, $n = 6$) untersucht. In reiner CaCl_2 -Lösung (nicht-physiologische Bedingungen) nahm der Partikeldurchmesser mit ansteigender Ca^{2+} -Konzentration deutlich zu (**a**). Im Bindungspuffer bewirkte die Zunahme der Ca^{2+} -Konzentration hingegen einen vergleichsweise minimalen Anstieg des Partikeldurchmessers (**a**) und auch über einen Zeitraum von über drei Stunden bei gleichbleibender Ca^{2+} -Konzentration (1,8 mM) stieg dieser (im Vergleich zur reinen CaCl_2 -Lösung) nur leicht an (**b**). BP: Bindungspuffer.

Bei der niedrigsten CaCl_2 -Konzentration von 0,7 mM CaCl_2 in Wasser änderte sich der hydrodynamische Durchmesser nur geringfügig und stieg lediglich auf 33 nm (AnxA5-VSOP) und 25 nm (M1234-VSOP) an. Bei einer Konzentration von 1,8 mM CaCl_2 stieg der Durchmesser der AnxA5-VSOP weiter an, die Durchmesser der AnxA5-VSOP und M1234-VSOP lagen jedoch mit 84 nm bzw. 25 nm, respektive, noch nah beieinander. Bei weiterer Zugabe von CaCl_2 nahm der Durchmesser insbesondere der AnxA5-VSOP weiter zu, bei der höchsten Konzentration von 2,8 mM CaCl_2 lag dieser bei 882 nm und die Partikel aggregierten. Der Durchmesser der M1234-VSOP nahm ebenfalls zu, lag jedoch mit 87 nm bei der gleichen CaCl_2 -Konzentration noch weit unter dem Durchmesser der AnxA5-VSOP. Im Bindungspuffer, also in Gegenwart weiterer Salze, stieg der Durchmesser der Partikel mit Zunahme der CaCl_2 -Konzentration nur leicht an. Im Bindungspuffer ohne CaCl_2 hatten die AnxA5-VSOP einen Durchmesser von 16 nm, welcher bis zur höchsten CaCl_2 -Konzentration von 2,8 μM auf 36 nm anstieg. Der Durchmesser der M1234-VSOP stieg unter den gleichen Bedingungen von 13 nm auf 17 nm an. Die zeitabhängige Größenmessung der Partikel in Bindungspuffer mit 1,8 mM CaCl_2 ist in Abbildung 4.16b gezeigt. Es war zwar ein Anstieg der Partikeldurchmesser zu verzeichnen, aber eine Sedimentation der Partikel unter diesen physiologischeren Salzbedingungen blieb in beiden Fällen aus. Der Durchmesser der AnxA5-VSOP stieg im Bindungspuffer mit 1,8 mM CaCl_2 von 21 nm auf 31 nm. Der Durchmesser der M1234-VSOP stieg nur von 13 nm auf 15 nm an. Die Durchmesser waren damit deutlich kleiner, als in der vergleichbaren reinen CaCl_2 -Lösung der gleichen Konzentration (1,8 mM CaCl_2), und waren vergleichbar mit dem Durchmesser der Partikel in Wasser.

Die Partikelstabilität in Serum und Blut wurde mittels Relaxivitätsmessungen untersucht, da man aufgrund des hohen Gehalts an Serumproteinen keine verlässlichen Größenmessungen von Partikeln mittels dynamischer Lichtstreuung erhält. Die Proteine werden dabei ebenfalls erfasst und überdecken die Messergebnisse. Bei Relaxivitätsmessungen kann dies ausgeschlossen werden, da hier die Änderung der Relaxationszeit des Serums bzw. des Bluts hervorgerufen durch die Partikel gemessen werden kann. Die Relaxivität R wird aus der Messung der Relaxationszeit T bei verschiedenen Eisenkonzentrationen ermittelt. Bei stabilen superparamagnetischen Nanopartikelsuspensionen, welche nicht aggregieren oder bei denen sich die Partikelgröße nicht ändert, ergibt sich aus der reziproken Relaxationszeit in Abhängigkeit von der Eisenkonzentration ein linearer Zusammenhang. Der daraus ermittelte Anstieg entspricht der Relaxivität der Partikel. Verändert sich die Partikelsuspension, sei es durch Aggregation oder Sedimentation der Partikel, verändert sich auch die Relaxationszeit und man erhält keinen stabilen Messwert und somit keinen linearen Zusammenhang. Infolgedessen lässt sich die Relaxivität der Partikel nicht bestimmen.

In Abbildung 4.17 sind die Messergebnisse der T_2 -Relaxationszeit in Abhängigkeit von der Eisenkonzentration für AnxA5-VSOP dargestellt. Es wurden dafür Partikelsuspensionen mit drei unterschiedlichen Eisenkonzentrationen (0,25 mM; 0,5 mM; 0,75 mM Fe) in Wasser,

fötalem Kälberserum (FCS) und Blut hergestellt und anschließend die jeweiligen Relaxationszeiten der Partikelsuspensionen sowie der verschiedenen Medien (Leerwert) gemessen. Für AnxA5-VSOP in Wasser wurde eine Relaxivität von $R_2 = 61 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ gemessen. Sowohl in Blut als auch in FCS haben die AnxA5-VSOP mit $R_2 = 73 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Blut) und $R_2 = 74 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ (FCS) eine höhere Relaxivität als in Wasser. Die in FCS suspendierten Proben wurden außerdem nach 24 Stunden erneut gemessen. Aus Abbildung 4.17 wird ersichtlich, dass sich die Relaxivität von $R_2 = 74 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ nicht veränderte und die Partikel auch nach 24 Stunden nicht aggregierten. Die Durchführbarkeit der Messungen deutet auf die Stabilität der Partikel in FCS und Blut hin. Die Relaxivitäten der Kontrollsonde M1234-VSOP konnten ebenfalls ermittelt werden, was wiederum auf stabile Suspensionen schließen lässt (Abbildung 4.18). Analog zu den AnxA5-VSOP ist auch hier ein Anstieg der Relaxivität im Vergleich von Wasser ($R_2 = 45 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) zu FCS ($R_2 = 56 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) bzw. Blut ($R_2 = 70 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) zu verzeichnen. Die Wiederholung der Relaxivitätsmessung in FCS nach 24 Stunden zeigte außerdem, dass sich die Relaxivität mit $R_2 = 59 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ nur geringfügig änderte und stützt ebenfalls die Annahme einer stabilen Suspension in FCS. Die T1-Relaxivitäten der AnxA5- und M1234-VSOP konnten in Wasser, Blut und FCS ebenso ermittelt werden (Tabelle 4.2; Anhang, Abbildung A.4, Abbildung A.5).

Tabelle 4.2: Relaxivitäten [$\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$] von AnxA5-VSOP und M1234-VSOP. Die Relaxivitätsmessungen wurden bei 0,94 T und 37 °C durchgeführt. ^aDie Relaxivität der Partikel in Wasser wurde berechnet unter der Annahme, dass ein Partikel über 6500 Eisenatome verfügt. ^bDie Messungen in FCS wurden zur Untersuchung der Partikelstabilität nach 24 Stunden wiederholt (Ergebnisse in Klammern).

	AnxA5-VSOP	M1234-VSOP
T1-Relaxivität (Fe) in Wasser	15	16
T2-Relaxivität (Fe) in Wasser	61	45
T1-Relaxivität (Partikel) in Wasser^a	98.000	104.000
T2-Relaxivität (Partikel) in Wasser^a	397.000	293.000
T1-Relaxivität (Fe) in Blut	16	17
T2-Relaxivität (Fe) in Blut	73	70
T1-Relaxivität (Fe) in FCS^b	18 (18)	17 (17)
T2-Relaxivität (Fe) in FCS^b	74 (74)	56 (59)

Zusätzlich wurden die AnxA5-VSOP in zwei verschiedenen Konzentrationen (0,25 mM; 0,75 mM Fe) in FCS und in reiner CaCl_2 -Lösung (1,8 mM) suspendiert und die T2-Relaxationszeiten gemessen, um den Unterschied zwischen stabilen und aggregierenden Partikeln zu zeigen (Abbildung 4.19). Die T2-Relaxationszeiten wurden direkt nach dem Suspendieren der Partikel über einen Zeitraum von einer Stunde und nach 24 Stunden erneut über eine Stunde gemessen. Während sich die T2-Relaxationszeiten der AnxA5-VSOP in FCS (19-20 ms bei 0,75 mM Fe; 55-52 ms bei 0,25 mM Fe) über 24 Stunden nicht änderten, konnte man bereits in den ersten Minuten einen Anstieg der T2-Relaxationszeiten für die Partikel in der 1,8 mM CaCl_2 -Lösung beobachten, was auf die Aggregation und anschließende Sedimentation der Partikel zurückzuführen war.

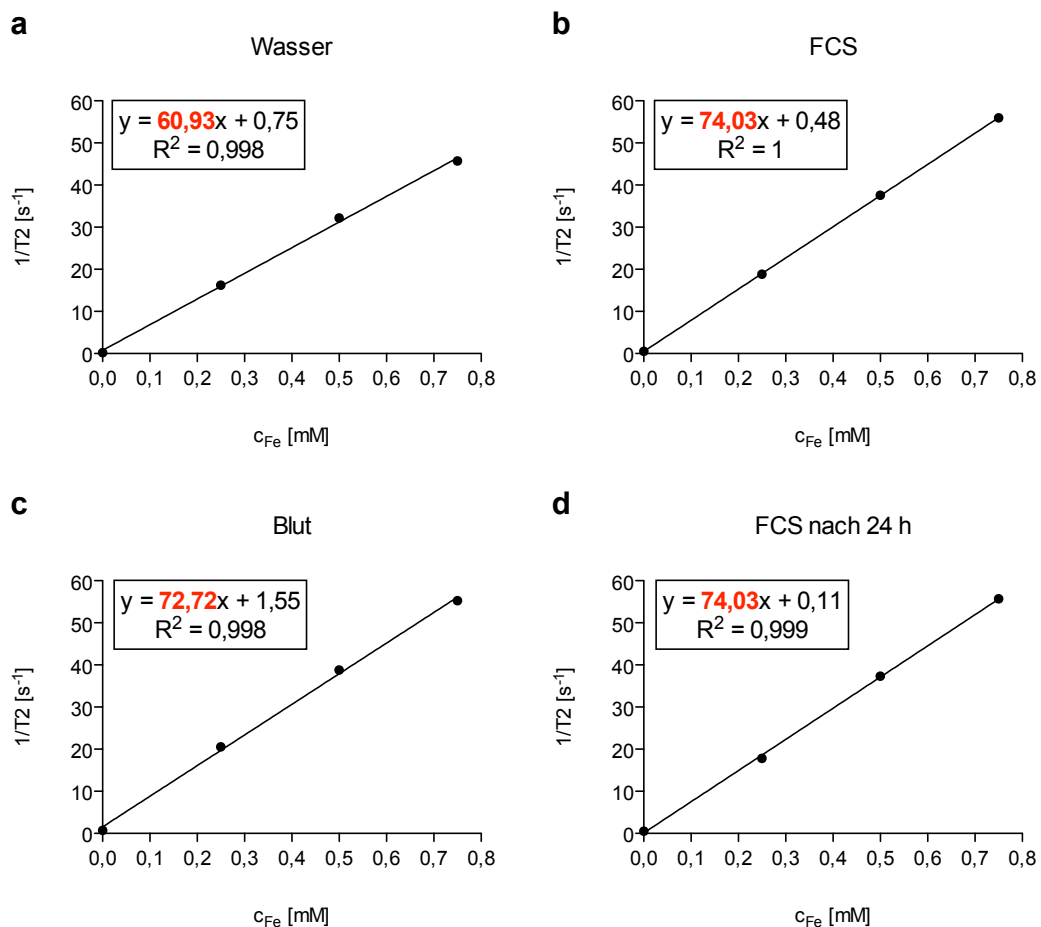


Abbildung 4.17: T2-Relaxivitätsmessung der AnxA5-VSOP in Wasser, Blut und FCS. Die in FCS suspendierten Proben wurden über 24 Stunden aufbewahrt und dann erneut gemessen. Dargestellt sind die reziproken T2-Relaxationszeiten in Abhängigkeit von der Eisenkonzentration. Der ermittelte Anstieg (rot) entspricht der jeweiligen Relaxivität.

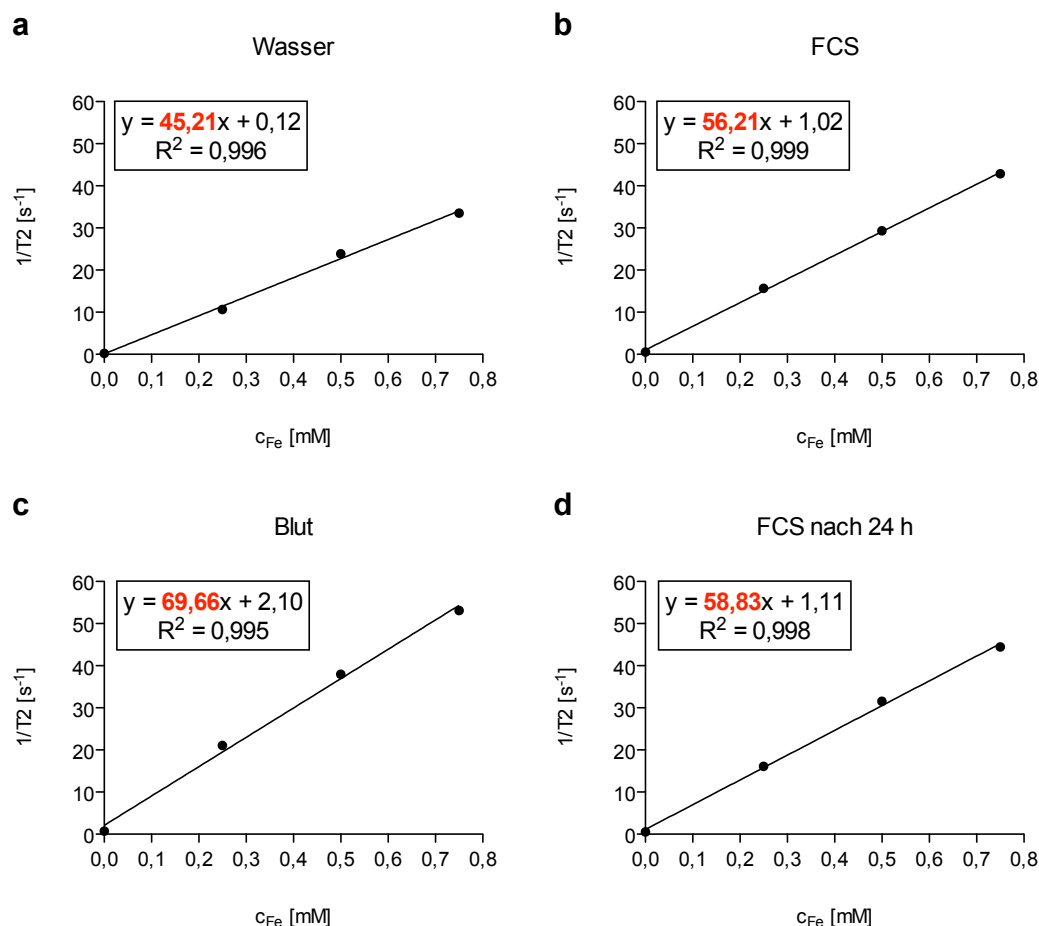


Abbildung 4.18: T2-Relaxivitätsmessung der M1234-VSOP in Wasser, Blut und FCS. Die in FCS suspendierten Proben wurden über 24 Stunden aufbewahrt und dann erneut gemessen. Dargestellt sind die reziproken T2-Relaxationszeiten in Abhängigkeit von der Eisenkonzentration. Der ermittelte Anstieg (rot) entspricht der jeweiligen Relaxivität.

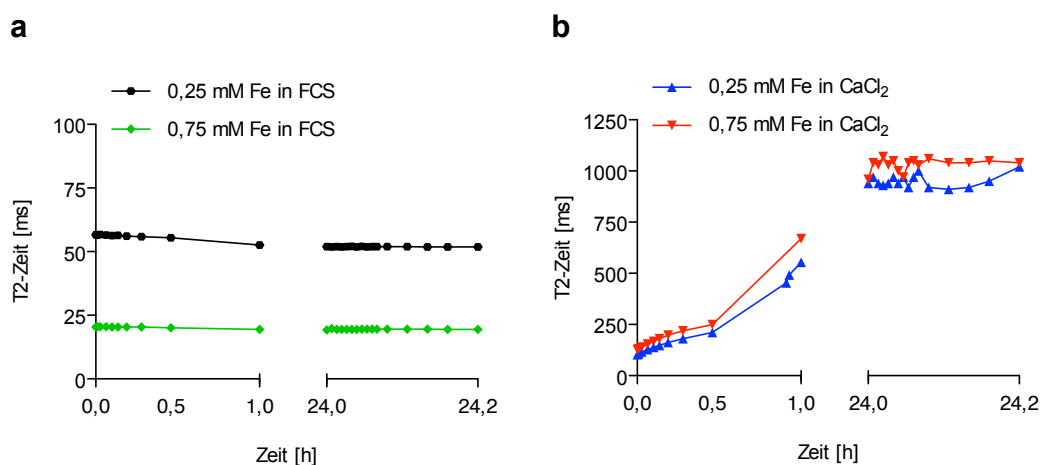


Abbildung 4.19: Messung der T2-Relaxationszeiten von AnxA5-VSOP in FCS und CaCl₂. In FCS änderte sich die T2-Relaxationszeit im Falle beider Eisenkonzentrationen nicht. Auch nach 24 Stunden blieben diese in FCS konstant (a). In der 1,8 mM CaCl₂-Lösung stieg die T2-Relaxationszeit aufgrund der einsetzenden Partikelaggregation bereits in den ersten Minuten stark an (b).

4.1.2.3. *In-vitro*-Untersuchung der spezifischen Bindung von AnxA5-VSOP an apoptotische Zellen

Die erfolgreiche Anwendung von AnxA5-VSOP als molekulare Bildgebungssonde für die Apoptose-Bildgebung ist abhängig von der spezifischen Bindung der Partikel an apoptotische Zellen. Dies wurde daher zunächst anhand eines Zellmodells *in vitro* untersucht, wobei Jurkat-T-Zellen als Zelllinie dienten. Durch Inkubation der Zellen mit Camptothecin (Abbildung 4.20), einem zelltoxischen Alkaloid, wurde in den Zellen Apoptose induziert.

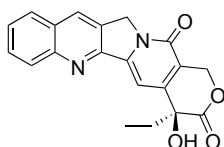


Abbildung 4.20: Strukturformel von Camptothecin. Durch Inkubation mit dem Alkaloid Camptothecin wird in Zellen Apoptose induziert [104].

Nach sechs Stunden Inkubation mit Camptothecin wurden sowohl behandelte als auch unbehandelte Zellen hinsichtlich ihrer Apoptoserate mittels Durchflusszytometrie untersucht (Anhang, Abbildung A.6). Nach Bestimmung des prozentualen Anteils apoptotischer Zellen wurden sowohl die unbehandelten als auch die behandelten Zellen jeweils mit AnxA5-VSOP und der Kontrollsonde M1234-VSOP über zehn Minuten inkubiert. Nach der Inkubation folgten zwei Waschschrte, um nichtgebundene Partikel zu entfernen. Zuletzt wurden die Zellpellets in Reaktionsgefäße (Volumen 200 µl) überführt, um sie am Folgetag in einem 1,5 Tesla MRT-Scanner zu messen. Für die MRT-Messung wurden die Reaktionsgefäße in 1%ige Agarose eingebettet und diese mit Wasser überschichtet. Als Messsequenz diente zunächst eine T2*-gewichtete Gradientenecho-Sequenz mit einer Repetitionszeit von TR = 200 ms und einer Echozeit von TE = 10,7 ms sowie einem Flipwinkel von FA = 40 °.

Geeignete Kontrastmittel bewirken in T2- und T2*-gewichteten Sequenzen eine Signalverminderung durch Verkürzung der T2- bzw. T2*-Relaxationszeiten und Bereiche, in denen sich das Kontrastmittel anreichert, erscheinen dunkler. In Abbildung 4.21 sind die MRT-Bilder ausgewählter Schichten (Querachse und Längsachse) zusammengefasst. Es wurden bspw. unbehandelte Zellen (6 % apoptotische Zellen) und behandelte Zellen (14 % apoptotische Zellen) nach Inkubation mit AnxA5-VSOP und nach Inkubation mit M1234-VSOP sowie ein Leerwert (Zellen ohne Partikel) gemessen. Die stärkste Signalverminderung war bei den behandelten Zellen nach Inkubation mit AnxA5-VSOP zu beobachten, gefolgt von den unbehandelten Zellen ebenfalls inkubiert mit AnxA5-VSOP. Bereits ein geringer Unterschied in der Anzahl apoptotischer Zellen von 6 % und 14 % ließ sich infolge der Bindung von AnxA5-

VSOP an apoptotische Zellen darstellen und es wurde eine wesentlich stärkere Signalverminderung bei den behandelten Zellen beobachtet (Abbildung 4.21a, b). Die Signalverminderung der Zellen nach Inkubation mit M1234-VSOP war nur unwesentlich stärker als bei den Leerproben und unterschied sich somit deutlich von der Signalverminderung hervorgerufen durch AnxA5-VSOP. Abbildung 4.21c zeigt ein weiteres Experiment mit einer höheren Anzahl apoptotischer Zellen. Auch hier wurde eine stärkere Signalverminderung im Falle der behandelten Zellen (47 % apoptotische Zellen) im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (9 % apoptotische Zellen) beobachtet.

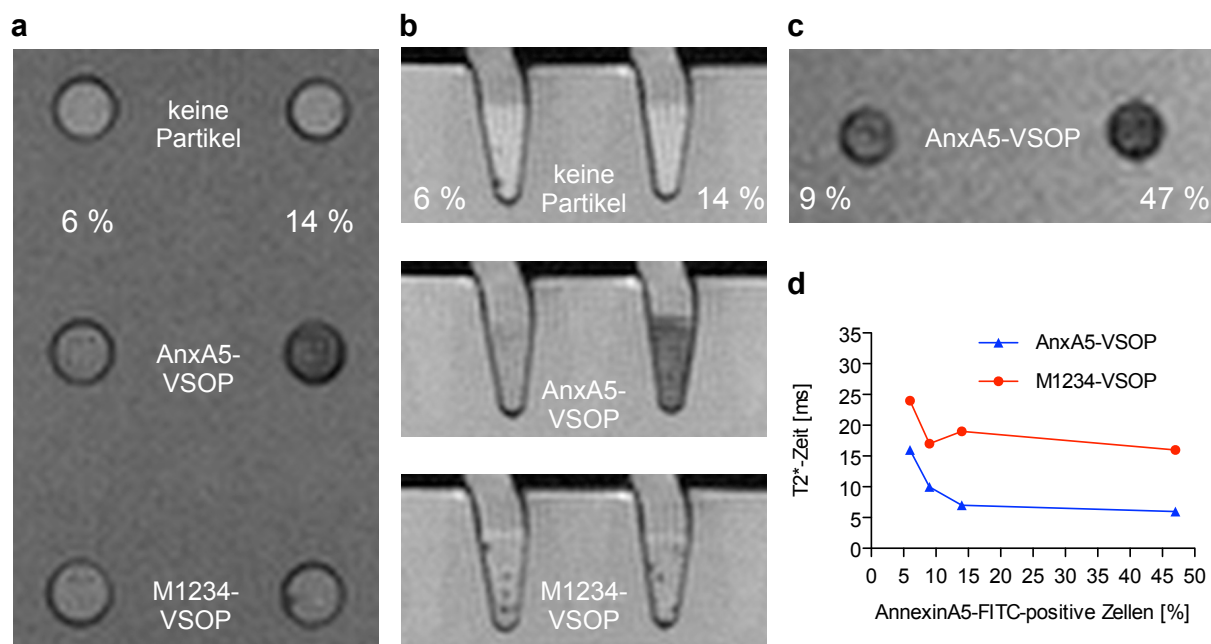


Abbildung 4.21: T2*-gewichtete MRT-Aufnahmen unbehandelter und Camptothecin-behandelter Jurkat-T-Zellen nach Inkubation mit AnxA5-VSOP und M1234-VSOP. Im Gegensatz zu der Kontrollsonde M1234-VSOP führte die Inkubation der apoptotischen Zellen mit AnxA5-VSOP zu deutlicher Signalverminderung in T2*-gewichteter MRT-Bildgebung. Sowohl ein geringer Unterschied in der Anzahl apoptotischer Zellen von 6 % (unbehandelt) und 14 % (Camptothecin-behandelt) (a, b) als auch ein hoher Unterschied von 9 % (unbehandelt) und 47 % (Camptothecin-behandelt) (c) wurde durch die unterschiedliche Signalverminderung infolge der spezifischen Bindung von AnxA5-VSOP sichtbar gemacht. Die ermittelte T2*-Relaxationszeit nahm nach Inkubation mit AnxA5-VSOP mit zunehmender Anzahl apoptotischer Zellen ab und lag in jedem Fall niedriger als bei den Zellen, welche mit M1234-VSOP inkubiert wurden (d).

Für eine messbare Beurteilung der Signalverminderung wurden die $T2^*$ -Relaxationszeiten der verschiedenen Proben ermittelt. Die Relaxationszeiten können als messtechnisch weitgehend unabhängige Gewebeparameter betrachtet werden. Die Ermittlung der $T2^*$ -Relaxationszeiten erfolgte durch Messung der gleichen Schicht bei einer gleichbleibenden Repetitionszeit von $TR = 100$ ms und bei zwölf verschiedenen Echozeiten von $TE = 3,1$ ms bis $TE = 44,8$ ms mit einer Multiechosequenz. Mit höherer Echozeit nimmt die Signalverminderung zu und die gemessene Signalintensität nimmt exponentiell ab. Die Relaxationszeit $T2^*$ steht dabei in folgendem mathematischen Zusammenhang mit der gemessenen Signalintensität S in Abhängigkeit von der Echozeit TE :

$$S(TE) = S_0 \cdot e^{-TE/T2^*}$$

Bei zwölf Echozeiten ergaben sich somit zwölf MRT-Bilder, welche mit Hilfe der Software *Osirix* und *ImageJ* ausgewertet wurden. Der jeweilige interessierende Bereich (*region of interest*, ROI) wurde markiert und die dazugehörige Signalintensität ausgelesen. Die ermittelten Signalintensitäten der einzelnen Proben in Abhängigkeit von der Echozeit TE sind in Abbildung 4.22 als Diagramm dargestellt. Die daraus berechneten $T2^*$ -Relaxationszeiten sind in Tabelle 4.3 zusammengefasst. Für die Proben der Camptothecin-behandelten Zellen, welche mit AnxA5-VSOP inkubiert wurden, wurden die kürzesten Relaxationszeiten von $T2^* = 7$ ms (14 % apoptotische Zellen) und $T2^* = 6$ ms (47 % apoptotische Zellen) ermittelt. Während die Zellproben, welche mit M1234-VSOP inkubiert wurden, wesentlich längere $T2^*$ -Relaxationszeiten von $T2^* = 16$ -24 ms aufwiesen. Die ermittelten $T2^*$ -Relaxationszeiten für AnxA5-VSOP und M1234-VSOP in Abhängigkeit von der Anzahl der apoptotischen Zellen sind in Abbildung 4.21d als Diagramm dargestellt.

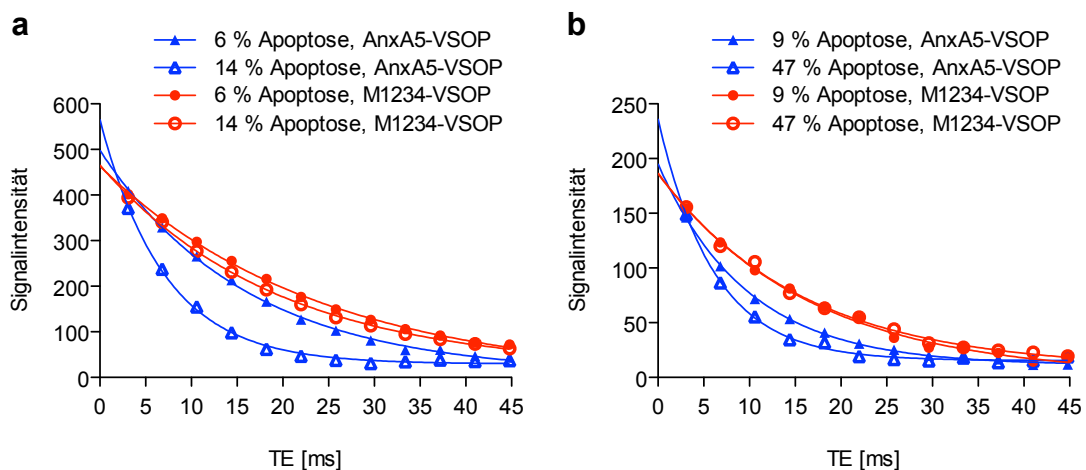


Abbildung 4.22: Gemessene MRT-Signalintensitäten in Abhängigkeit von der Echozeit TE für unbehandelte und Camptothecin-behandelte Jurkat-T-Zellen nach Inkubation mit AnxA5-VSOP und M1234-VSOP bei niedriger (a) und hoher (b) Anzahl apoptotischer Zellen. Die Messungen wurden mit einer Multiechosequenz und einer Repetitionszeit von $TR = 100$ ms durchgeführt.

Tabelle 4.3: Ermittelte T2*-Relaxationszeiten der unbehandelten und behandelten Jurkat-T-Zellen nach Inkubation mit AnxA5-VSOP und M1234-VSOP bei unterschiedlicher Anzahl apoptotischer Zellen. Die T2*-Relaxationszeiten wurden aus ROIs basierend auf T2*-gewichteten MRT-Bildern bei verschiedenen Echozeiten berechnet.

	unbehandelt (6 % apoptotische Zellen)	Camptothecin-behandelt (14 % apoptotische Zellen)
AnxA5-VSOP	16 ms	7 ms
M1234-VSOP	24 ms	19 ms
	unbehandelt (9 % apoptotische Zellen)	Camptothecin-behandelt (47 % apoptotische Zellen)
AnxA5-VSOP	10 ms	6 ms
M1234-VSOP	17 ms	16 ms

4.1.2.4. *In-vivo*-Untersuchung der Signalintensitätshalbwertszeit von AnxA5-VSOP im Blut und der spezifischen Bindung von AnxA5-VSOP an apoptotische Zellen

Die *in-vivo*-Untersuchungen der AnxA5-VSOP müssen als vorläufige Experimente angesehen werden, welche noch nicht den Anspruch auf Vollständigkeit, insbesondere in Hinblick auf Kontrollversuche, erfüllen. Sie stellen lediglich einen Ausblick dar und sollen in weiteren Studien erweitert werden.

Die Versuche zur Bestimmung der Signalintensitätshalbwertszeit im Blut wurden durchgeführt von Franziska Appler (AG Schellenberger, Experimentelle Radiologie, *Charité - Universitätsmedizin Berlin*). Die *in-vivo*-Untersuchung der spezifischen Bindung der AnxA5-VSOP an apoptotische Zellen wurde durchgeführt von Howard Chen (AG David Sosnovik) am *Martinos Center for Biomedical Imaging (Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School)* in Boston, Massachusetts.

Die Signalintensitätshalbwertszeit der AnxA5-VSOP im Blut wurde in athymischen Nacktmäusen ermittelt. Dafür wurde die MRT-Signalintensität in der linken Herzkammer der Mäuse vor und nach Partikelgabe gemessen. Für die AnxA5-VSOP wurde eine Signalintensitätshalbwertszeit im Blut von $20,6 \pm 3,3$ min ($n = 4$) ermittelt. Die gemessenen Signalintensitäten in Abhängigkeit von der Zeit sind in Abbildung 4.23 dargestellt. Die gemessene Signalintensität S nimmt dabei in Abhängigkeit von der Zeit t exponentiell ab. Die Halbwertszeit $t_{1/2}$ ergibt sich dabei aus folgendem mathematischen Zusammenhang:

$$S(t) = S_0 \cdot e^{-K \cdot t}$$

$$t_{1/2} = \ln 2 / K$$

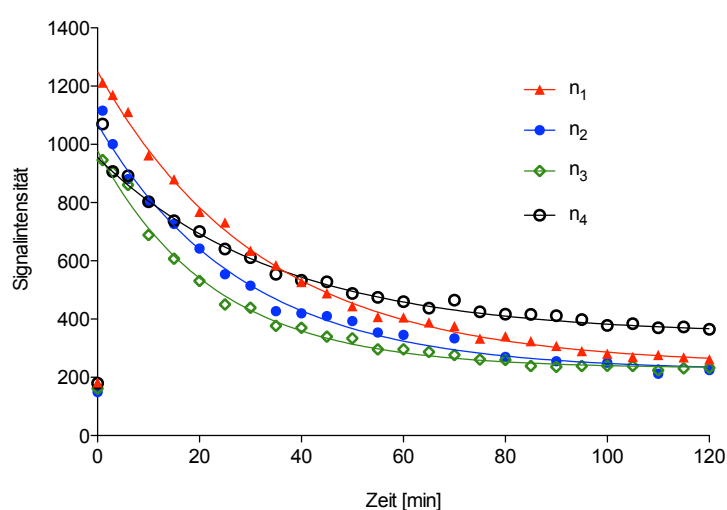


Abbildung 4.23: Gemessene Signalintensitäten in Abhängigkeit von der Zeit zur Bestimmung der Signalintensitätshalbwertszeit im Blut von AnxA5-VSOP. Die Partikel hatten eine Halbwertszeit von $20,6 \pm 3,3$ min ($n = 4$).

Anhand eines kardialen Ischämie-Reperfusion-Modells in Mäusen wurde in einem ersten Experiment die Fähigkeit der AnxA5-VSOP als Apoptosesonde im Rahmen einer Kooperation mit Prof. Sosnovik (*Harvard Medical School*, Boston, Massachusetts) getestet. Durch Ligation der linken Koronararterie für 35 min und anschließender Reperfusion wurden Teile des Herzmuskels (Myokard) der linken Herzkammer geschädigt. Mit Einsetzen der Reperfusion wurden die AnxA5-VSOP (bzw. als Referenz die M1234-VSOP) intravenös in die Schwanzvene injiziert und die Signalintensitäten im Herzen nach drei Stunden gemessen. In einem Kontrollversuch wurde eine Maus mit der gleichen Schädigung, jedoch ohne Partikelgabe, analog untersucht. Abbildung 4.24 fasst die Ergebnisse der MRT-Messung bei unterschiedlichen Echozeiten zusammen. Während bei einer Echozeit von $TE = 1$ ms der Myokard uniform erschien, sah man im Falle der AnxA5-VSOP-Gabe bei höheren Echozeiten, insbesondere bei einer Echozeit von $TE = 5$ ms, dass das Signal im geschädigten Myokard

in Folge der Partikelanreicherung stark abnahm (Abbildung 4.24a-c). Bei der Kontrollmaus ohne Partikelgabe war bei unterschiedlichen Echozeiten die Signalintensität im Myokard uniform und es konnte keine Signalabschwächung beobachtet werden (Abbildung 4.24d, e). Die Aufnahme der Kontrollsonde M1234-VSOP im geschädigten Myokard war außerdem erheblich geringer (Abbildung 4.24f) und es konnte nur bei einer noch höheren Echozeit eine minimale Signalverminderung beobachtet werden, welche sich jedoch deutlich von der durch die AnxA5-VSOP hervorgerufene Anreicherung unterschied.

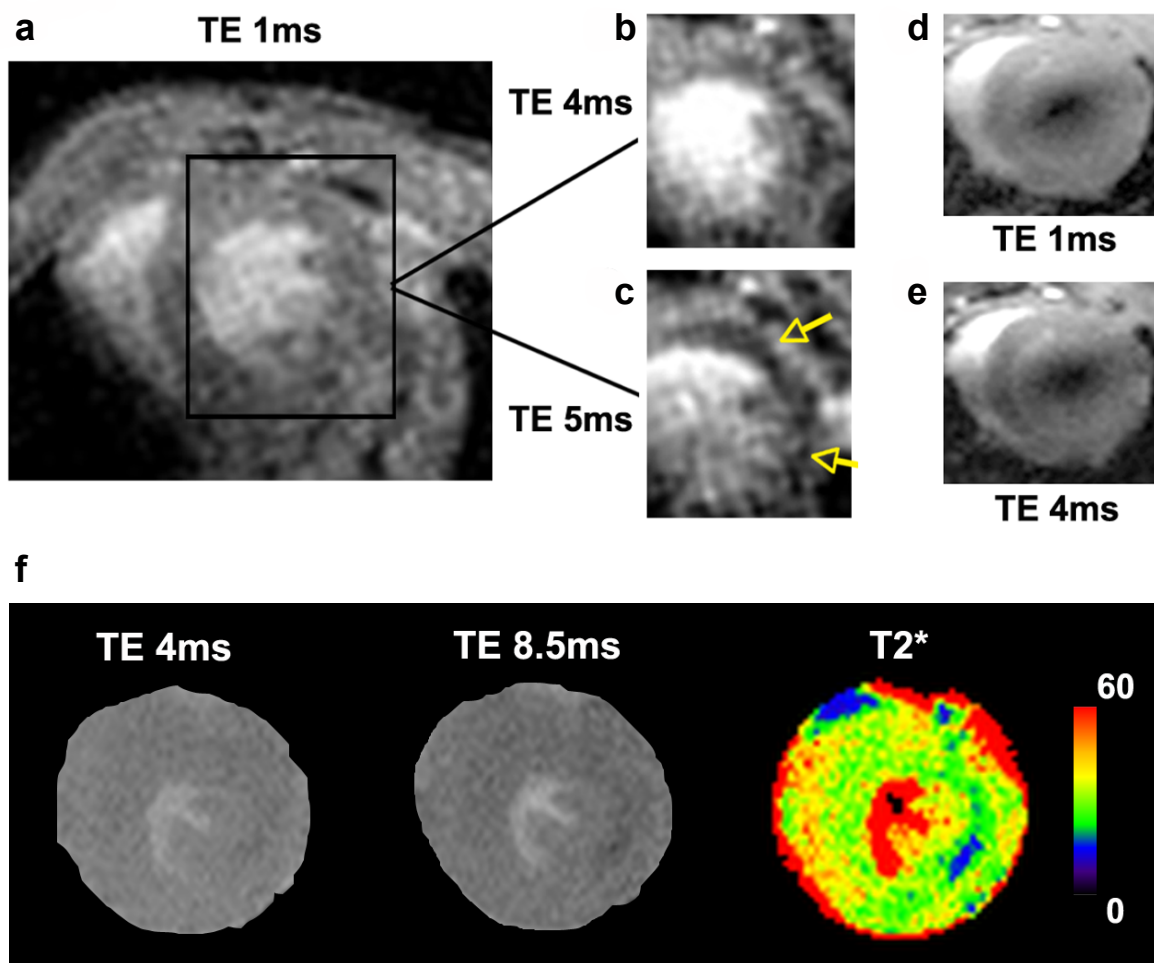


Abbildung 4.24: In-vivo-MRT-Aufnahme des Herzens einer Maus mit Ischämie-Reperfusion drei Stunden nach der Injektion von AnxA5-VSOP. Bei einer Echozeit von TE = 1 ms war die Signalintensität im Myokard uniform (a). Bei einer Echozeit von TE = 4 ms war eine Signalabschwächung in großen Teilen der linken Herzkammer zu sehen (b), die bei einer Echozeit von TE = 5 ms noch deutlicher hervortrat (Pfeile) (c). Bei der Kontrollmaus (gleiche Myokardschädigung, keine Partikelinjektion) war die Signalintensität sowohl bei einer Echozeit von TE = 1 ms als auch bei einer Echozeit von TE = 4 ms uniform (d, e). Die Injektion der Kontrollsonde M1234-VSOP bewirkte nur eine undeutliche Signalabschwächung bei einer Echozeit von TE = 4 ms bzw. von TE = 8,5 ms. Die farbkodierte Darstellung der T2*-Relaxationszeiten belegt, dass sich die Partikel in der Herzkammer nur gering anreicherten und lediglich in kleinen Bereichen ist eine Verkürzung der T2*-Relaxationszeit zu sehen (f).

4.1.3. Diskussion

4.1.3.1. AnxA5-Peptid-VSOP

Für die Synthese der AnxA5-Peptid-AnxA5-Konjugate wurde eine AnnexinA5-Variante genutzt, welche eine frei zugängliche Cysteinseitenkette aufweist. Diese befindet sich auf der konkaven Seite des Proteins, während sich die Ca^{2+} -Bindungstaschen und folglich die Bindungsstellen für Phosphatidylserin auf der konvexen Seite des Proteins befinden, und konnte somit für die Konjugation des Proteins ohne Bindungsverlust genutzt werden. Ausgehend von früheren Arbeiten, bei denen AnxA5 an das polykationische Protamin gekoppelt wurde, wurde in der vorliegenden Arbeit außerdem ein synthetisches polykationisches Peptid eingesetzt. Dessen definierte Struktur sollte im Gegensatz zum Peptidgemisch des Protamins eine quantitative und qualitative Analyse ermöglichen. Um eine möglichst hohe Abdeckung der VSOP-Oberfläche sowie des Peptids mit AnxA5 zu erreichen und so unspezifische Wechselwirkungen der AnxA5-beschichteten VSOP zu minimieren, verfügte das Peptid über zwei Kopplungsstellen für die Reaktion mit einem Kopplungsreagenz und letztlich für die Konjugation mit AnxA5.

Sowohl mit dem Kopplungsreagenz SPDP als auch mit Sulfo-SMCC konnte das gewünschte Konjugat AnxA5-K1.1a-AnxA5 (K1.2a) bzw. AnxA5-K1.3a-AnxA5 (K1.4a) hergestellt werden (Abbildung 4.7, Abbildung 4.11). Allerdings bildete sich in beiden Fällen nach der Umsetzung des Peptids mit den Kopplungsreagenzien ein Produktgemisch und es waren hohe Verluste zu verzeichnen. Die Hydrolyse aber auch die Reaktivität des Kopplungsreagenz ist bedingt durch den pH-Wert und die Temperatur. Umso höher der pH-Wert und die Temperatur, desto schneller reagiert der Succinimidylester mit der primären Aminogruppe, aber desto schneller ist auch die Hydrolyse der Ester [156, 162, 163]. Durch die gewählten Reaktionsbedingungen wurde versucht, die Hydrolysetendenz zu vermindern und eine möglichst hohe Umsetzung des Peptids über den Succinimidylester zu erzielen. Tatsächlich wurden durch die Reaktion mit SPDP 95 % des Peptids umgesetzt (Abbildung 4.4) und die Reaktion mit Sulfo-SMCC erzielte sogar eine vollständige Umsetzung des Peptids (Abbildung 4.8). Durch die chemoselektive Reaktion von SPDP bzw. Sulfo-SMCC mit dem Peptid P1 konnten jedoch bereits drei verschiedene Produkte entstehen (Reaktion am C-Terminus, Reaktion am N-Terminus, Reaktion an beiden Termini). Durch Spaltung der Disulfidbrücke (SPDP), Reaktion der Maleimidgruppe (Sulfo-SMCC) mit den Aminogruppen und möglicher anschließender Hydrolyse des Succinimidylesters, aber auch der Maleimidgruppe, können noch weitere Produkte entstehen.

Aus der Reaktion des Peptids mit SPDP bildete sich neben dem gewünschten Produkt AnxA5-K1.1a-AnxA5 (K1.2a) laut MS-Analyse ein Nebenprodukt mit einer Masse von 4270 m/z (Abbildung 4.5). Diese ließ sich jedoch nicht, wie vielleicht zu erwarten, dem ein-

fach aktivierten Peptid P1-SPDP (K1.1b) (4181 g/mol) zuordnen. Vielmehr entsprach die Masse beidseitig aktiviertem Peptid, bei dem eine der Disulfidbindungen gespalten wurde und das Peptid somit über eine freie Thiolgruppe verfügte. Dieses Nebenprodukt wies demnach nur noch eine thiolreaktive Gruppe für die Umsetzung mit AnxA5 auf. Aus der Reaktion des Peptids mit Sulfo-SMCC bildete sich laut MS-Analyse neben dem gewünschten Produkt AnxA5-K1.3a-AnxA5 (K1.4a) hingegen ein Nebenprodukt mit höherer Masse, welches somit ebenfalls nicht einfach aktiviertem Peptid zugeordnet werden konnte (Abbildung 4.9). Darüber hinaus gelang es nicht, die gefundene Masse einem vorstellbarem Nebenprodukt zuzuordnen. Aus der Reaktion der Maleimidgruppe mit primären Aminogruppen (und z. B. anschließender Hydrolyse des Succinimidylesters oder Verknüpfung der Peptide) gehen bspw. Nebenprodukte hervor, dessen Massen nicht mit der zweiten gefundenen Masse übereinstimmen.

Nach der Reinigung über Größenausschlusschromatographie betrug die Ausbeute des umgesetzten Peptids nur 10 % (SPDP) bzw. 7 % (Sulfo-SMCC). Als Ursache für die geringen Ausbeuten wurden Wechselwirkungen des Peptids mit dem Säulenmaterial Sephadex™ angenommen. Die starke positive Ladung des Peptids bewirkte vermutlich, dass die Probe teilweise zurückgehalten wurde, so dass die Elution nicht nur verzögert wurde, sondern auch ein Teil der Probe verloren ging. Die starken Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial konnten bereits in eigenen Versuchen mit Protaminproben beobachtet werden. Beim Versuch diese alternativ zum verwendeten Sephadex™-Gel über Säulenmaterial auf Basis von Polyacrylamidgelen zu reinigen, verblieben diese sogar vollständig auf dem Säulenmaterial. Bei stark geladenen Molekülen würde sich die Reinigung über die Ionenaustauschchromatographie anbieten. Da das verwendete Peptid nach Reaktion mit dem Kopplungsreagenzien jedoch leicht ausgefällt wurde, wurde auf die Verwendung der Ionenaustauschchromatographie und den damit verbundenen hohen Salzeinsatz verzichtet. Auch das Entsalzen und Umpuffern nach der Ionenaustauschchromatographie konnte so umgangen werden.

Obwohl in beiden Fällen das einfach aktivierte Peptid nicht gebildet wurde, entstand aus der Umsetzung der aktivierten Peptide mit AnxA5 neben dem gewünschten Konjugat AnxA5-K1.1a-AnxA5 (K1.2a) bzw. AnxA5-K1.3a-AnxA5 (K1.4a) jeweils auch das einfach konjugierte Peptid (K1.1b-AnxA5 bzw. K1.3b-AnxA5) (Abbildung 4.7, Abbildung 4.11). Von der aktivierten Zwischenstufe SPDP-P1-SPDP (K1.1a) reagierten ferner nur 54 % mit AnxA5. Die geringe Umsetzung wurde zum einen mit der gehemmten Reaktion von AnxA5 erklärt. Es konnte bereits in anderen Synthesen beobachtet werden, dass AnxA5 nicht vollständig reagiert [64, 164]. Darüber hinaus dimerisierte ein Teil des AnxA5 und die Cysteinseitenkette war somit nicht mehr für die Reaktion zugänglich. Zum anderen kann die geringe Umsetzung möglicherweise auch auf das gebildete Nebenprodukt mit der Masse von $m/z = 4270$ zurückgeführt werden, welches ebenfalls die Bildung des einfach konjugierten Peptids K1.1b-AnxA5 (K1.2b) erklären würde. Die aktivierte Zwischenstufe SMCC-P1-SMCC (K1.3a)

wurde hingegen vollständig umgesetzt und das einfach konjugierte Peptid K1.3ba-AnxA5 (K1.4b) und das doppelt konjugierte Peptid AnxA5-K1.3a-AnxA5 (K1.4a) ungefähr im Verhältnis 1:1 gebildet. Das Gemisch aus K1.4b und K1.4a ließ sich auch hier auf eine gehemmte Reaktion des AnxA5 sowie die Bildung des Nebenproduktes ($m/z = 4528$) zurückführen. Der Reaktionsansatz wurde bei der Größenausschlusschromatographie in zwei Fraktionen geteilt und das einfach konjugierte Peptid K1.3ba-AnxA5 (K1.4b) abgetrennt, während das gewünschte Konjugat AnxA5-K1.3a-AnxA5 (K1.4a) zu einer ähnlichen Zeit wie das wesentlich kleinere AnxA5 eluierte (Abbildung 4.10, Abbildung 4.11). Die verzögerte Elution wurde auch hier mit der Wechselwirkung des polykationischen Peptids mit dem Säulenmaterial Sephadex™ G100 begründet.

Für die elektrostatische Beschichtung der VSOP war ein Gemisch aus AnxA5 und dem Konjugat AnxA5-K1.3a-AnxA5 (K1.4a) weniger problematisch als ein Gemisch aus Konjugat K1.3ba-AnxA5 (K1.4b) und Konjugat AnxA5-K1.3a-AnxA5 (K1.4a), da das freie AnxA5 ohne Modifizierung nicht an die Citrathülle bindet, so dass die erhaltenen Fraktionen zur Beschichtung eingesetzt werden konnten. Die Größenmessung der erhaltenen Partikelsuspension zeigte, dass die Zugabe der VSOP zur AnxA5-K1.3a-AnxA5-Lösung tatsächlich elektrostatisch beschichtete Partikel erzielte, welche nach der Reinigung über MACS®-Säulen einen hydrodynamischen Durchmesser von $20,9 \pm 1,0$ nm aufwiesen (Abbildung 4.12). Auch wenn die Reinigung der AnxA5-Peptid-VSOP über MACS®-Säulen mit Verlusten verbunden war, konnte jedoch gezeigt werden, dass sich die gewünschten Partikel ausgebildet haben. Es erfolgte keine Berechnung der Ausbeute, da die Eisenkonzentration zu niedrig war, als dass man einen verlässlichen Eisengehalt ermitteln konnte.

Die Beschichtung elektrostatisch stabilisierter Eisenoxidpartikel mit stark geladenen Molekülbausteinen stellt grundsätzlich ein einfaches und modulares System dar, auch wenn in diesem Falle keine Aussage über die Stabilität der Beschichtung oder der spezifischen Bindung bzw. Anreicherung der Partikel getroffen werden konnte. Es bietet den Vorteil mit einem Molekülanker verschiedene Wirkstoffe oder Komponenten auf der Oberfläche zu binden, welche im Vorfeld (im Sinne einer konvergenten Synthese) hergestellt und bereitgestellt werden können. Da jedoch sowohl das Peptid als auch das AnxA5 sehr kostenintensiv in der Anschaffung sind, wurde aufgrund der geringen Ausbeuten und hohen Verluste insbesondere bei der Herstellung des AnxA5-Peptid-AnxA5-Konjugats, darauf verzichtet, die Synthese AnxA5-beschichteter VSOP über einen polykationischen Peptidanker weiter zu verfolgen. Auch die erneute Übertragung der gewonnenen Erkenntnisse auf Protamin erschien wenig attraktiv. Vielmehr stellt eventuell die zunehmend einfacher werdende rekombinante Gewinnung von AnxA5-Konstrukten, welche bereits über eine Polylysine- oder Polyargininsequenz verfügen, eine gute Alternative dar. Die polykationische Sequenz ließe sich nicht nur für die elektrostatische Anbindung nutzen, sondern auch für die Reinigung des Konstrukts über Ionenaustauschchromatographie.

4.1.3.2. AnxA5-VSOP

Eine optimale Funktionalisierung von Nanopartikeln wird erreicht, wenn gleichzeitig verschiedene Kriterien (z. B. Kontrolle über die Menge an gebundenem Biomolekül pro Partikel oder Kontrolle über die Orientierung bzw. der Ausrichtung des Biomoleküls auf der Partikeloberfläche) erfüllt werden [102, 103]. Im Folgenden sollen die Ergebnisse der AnxA5-VSOP-Synthese diskutiert und in Hinblick auf verschiedene allgemein zutreffende Kriterien bewertet werden.

Synthese und Charakterisierung von AnxA5-VSOP

Bei der vorgestellten zweistufigen Synthese der AnxA5-VSOP erfolgt die Funktionalisierung der VSOP durch kovalente Bindung der AnxA5-Moleküle an Carboxygruppen der Citrathülle (Abbildung 4.13). Für die Reaktion der Carbonsäuren mit den Aminogruppen des AnxA5 wurden die Carbonsäuren mit EDC und Sulfo-NHS zunächst aktiviert. Die Carbodiimid-Chemie stellt eine milde Methode zur Verknüpfung von Carbonsäuren und primären Aminogruppen dar, weist jedoch den Nachteil auf, dass sowohl EDC und der gebildete O-Acylisoharnstoff schnell hydrolysieren [88, 102]. Aufgrund der Hydrolyseempfindlichkeit wird EDC, wie auch in der vorliegenden Arbeit, meist in hohem Überschuss eingesetzt. Das kann jedoch eine Überaktivierung der Oberfläche bewirken. Insbesondere bei elektrostatisch stabilisierten Partikeln hat dies häufig eine Ausfällung der Partikel zur Folge [88, 102]. Um dies zu verhindern, wurde dem Reaktionsgemisch zusätzlich Sulfo-NHS zugesetzt, welches rasch mit dem O-Acylisoharnstoff reagiert und sich ein Succinimidylester bildet. Die Sulfonsäure diente dabei dem Erhalt der negativen Ladung und folglich der elektrostatischen Stabilisierung und verhinderte eine Aggregation der VSOP. Der aminreaktive Succinimidylester wies zudem unter den gegebenen Bedingungen (MES-Puffer, pH 6,0) eine höhere Stabilität als der O-Acylisoharnstoff auf [156, 162, 163]. Bei einer Überaktivierung der Partikeloberfläche ist die Beladungsdichte nur bedingt kontrollierbar [102]. Im Falle der AnxA5-VSOP sollte eine Überaktivierung jedoch wenig problematisch sein, da eine vollständig abgedeckte VSOP-Oberfläche gewünscht war. Letztlich hydrolysieren die unreaktierten Succinimidylester und es liegen wieder die Carboxygruppen vor. Vor der Zugabe der aktivierten VSOP zu der AnxA5-Lösung war eine Reinigung der Partikel unabdingbar, um zu verhindern, dass die Carboxygruppen von AnxA5 durch die vorliegenden Glutamin- und Asparaginsäuren [32] mittels EDC aktiviert werden und die AnxA5-Moleküle miteinander reagieren. Darüber hinaus stellen insbesondere die Aminosäuren Glutamin- und Asparaginsäure die Ca^{2+} -Bindungsstellen [154]. Reagieren diese Aminosäuren, könnte AnxA5 seine Bindungseigenschaften verlieren.

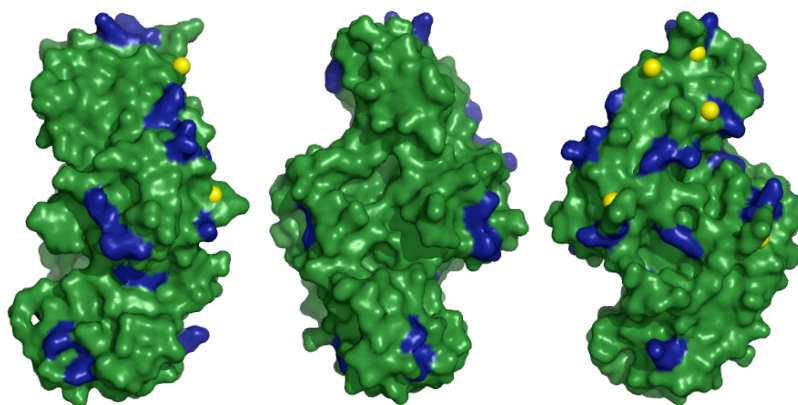


Abbildung 4.25: Räumliche Darstellung von Annexin A5 aus drei Richtungen [166]. Das Protein liegt in einer leicht gebogenen Konformation vor (links) und verfügt somit über eine konkave (mitte) und eine konvexe (rechts) Seite. Die Ca^{2+} -Bindungstaschen und das koordinierte Calcium (gelb) befinden sich auf der konvexen Seite des Proteins. Die für die VSOP-Beschichtung genutzten Lysine (blau) sind auf der gesamten Oberfläche des Proteins verteilt.

Bei der kovalenten Bindung von AnxA5 über die Lysinseitenketten an die Citrathülle ist zu bedenken, dass die Reaktion nicht chemoselektiv abläuft. Annexin A5 verfügt über 320 Aminosäuren von denen 22 Lysine sind [32, 165]. Ein Großteil der Lysine liegt auf der Oberfläche des Proteins und ist somit frei zugänglich. Abbildung 4.25 zeigt in einem Röntgenstrukturmodell die räumliche Gestalt von Annexin A5 aus verschiedenen Richtungen, bei dem sowohl die Lysine (blau) als auch das Calcium (gelb), welches in den Ca^{2+} -Bindungstaschen koordiniert vorliegt, markiert sind. Die räumliche Gestalt des Proteins gibt wieder, dass Annexin A5 eine konkave und eine konvexe Seite besitzt. Die Bindung von Annexin A5 an Phosphatidylserin apoptotischer Zellen erfolgt über die Ca^{2+} -Bindungstaschen, welche hauptsächlich auf der konvexen Seite angesiedelt sind [33]. Man sieht allerdings deutlich, dass auch ein Großteil der Lysine auf der konvexen Seite zu finden sind. Würde die Bindung von Annexin A5 bzw. AnxA5 (Cys-Variante) an die Citrathülle ausschließlich über die konvexe Seite stattfinden, hätte dies einen starken Bindungsverlust zur Folge. Allerdings sind ebenso Lysine auf der konkaven Seite zu finden, welche mit der Citrathülle reagieren können. Durch die hohe Anzahl der Lysine und die damit verbundenen möglichen Reaktionsstellen, sollte jedoch der Erhalt der Bindungsaffinität zu Phosphatidylserin bei einem Teil der gekoppelten AnxA5-Moleküle erhalten bleiben. Wichtig ist auch, dass mehrere Lysine an die Citrathülle gekoppelt werden können, um die Stabilität der Bindung von AnxA5 an die Citrathülle zu erhöhen. Dies ist besonders wünschenswert, da das Citrat nicht kovalent, sondern vermutlich über eine Komplexbindung an die Eisenoxidoberfläche gebunden ist [59]. Somit ergibt sich bei Reaktion mehrerer Lysinseitenketten ein Chelateffekt und infolgedessen eine höhere Stabilität, als wenn AnxA5 über nur eine Seitenkette mit einer Carboxygruppe des Citrats reagieren würde.

Für eine möglichst vollständige Abdeckung der VSOP-Oberfläche wurde AnxA5 ebenfalls in hohem Überschuss (30 AnxA5 / VSOP) eingesetzt. Annexin A5 bildet von sich aus auf der

Oberfläche von Phosphatidylserin-präsentierenden Zellen Cluster, was die Annahme erlaubt, dass eine hohe AnxA5-Dichte auf der Partikeloberfläche keine Immunantwort auslöst [31]. Ferner ist aufgrund der Affinität von Calcium zu Citrat eine hohe Proteindichte auf dem Partikel wünschenswert, um so ungewollte Wechselwirkungen der Partikel zu vermindern [160]. Das überschüssige AnxA5 wurde im Anschluss an die Synthese abgetrennt. Da EDC und Sulfo-NHS ebenfalls abgetrennt wurden, lag das überschüssige AnxA5 nach der Reaktion unverändert vor und konnte wiederverwendet werden. Aus der Reaktion von AnxA5 mit der aktivierten Citrathülle ging lediglich eine Amidbindung hervor, wodurch eine ungewollte Immunantwort, bspw. durch Bestandteile von Kopplungsreagenzien, ebenfalls verhindert werden sollte.

Da die beschichteten Protein-VSOP nachweislich frei an ungebundenem AnxA5 bzw. M1234 waren (Abbildung 4.15), konnte ausgehend von den ermittelten Eisen- und Proteinkonzentrationen abgeschätzt werden, wie viel Proteine pro Partikel gebunden wurden. Das ermittelte Verhältnis von Protein zu VSOP belief sich auf ca. 9:1 für AnxA5 und ca. 8,5:1 für M1234. Basierend auf diesen Daten, den TEM-Daten der VSOP (VSOP-Kerndurchmesser), den Daten aus der dynamischen Lichtstreuung (hydrodynamischer Durchmesser der AnxA5-VSOP) und der Kristallstruktur von Annexin A5 und Magnetit wurde dann mit Hilfe des Programms *PyMOL* ein Modell für die AnxA5-VSOP erstellt (Abbildung 4.26). Das Modell verdeutlicht, dass die VSOP-Oberfläche fast vollständig mit Protein bedeckt ist und so unspezifische Bindungen durch die VSOP-Oberfläche minimiert sein sollten. Die elektrostatische Stabilisierung wurde wahrscheinlich weitgehend durch eine sterische Stabilisierung durch AnxA5 ergänzt bzw. ersetzt.

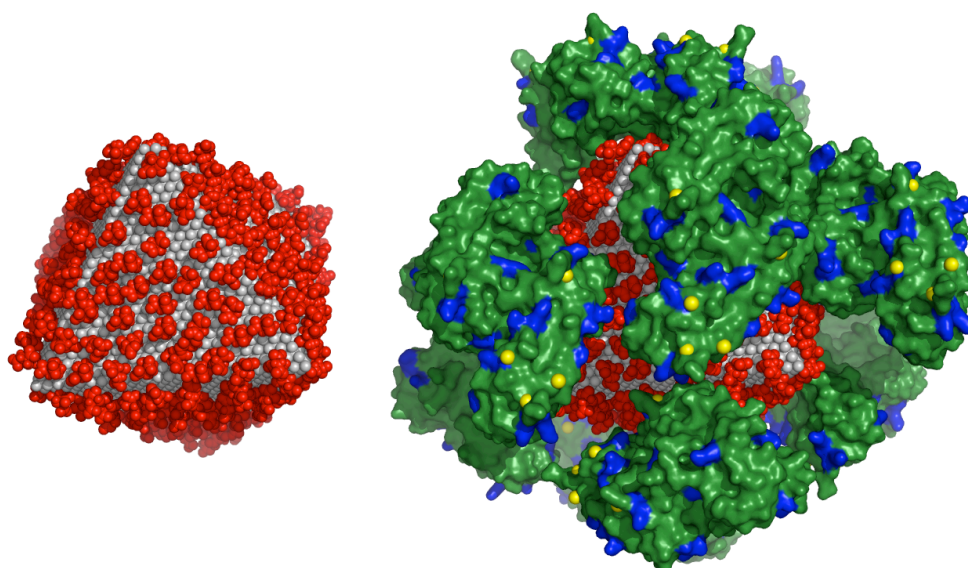


Abbildung 4.26: Modell von VSOP (links) und AnxA5-VSOP (rechts). Die Eisenoxidnanopartikel (grau) sind durch eine Citrathülle (rot) elektrostatisch stabilisiert. AnxA5 (grün) ist kovalent an die Citrathülle über eine Amidbindung zwischen Citrat und Lysin (blau) gebunden. Die Ca^{2+} -Ionen (gelb) koordinieren in den Ca^{2+} -Bindungstaschen.

Trotz des vergleichbaren Verhältnisses von Protein zu VSOP wichen die ermittelten Größen und Relaxivitäten der AnxA5-VSOP von denen der M1234-VSOP teilweise deutlich ab (Tabelle 4.4). Aufgrund der Mutationen in den Ca^{2+} -Bindungstaschen beim Referenzprotein M1234 verfügt dieses über eine andere Nettoladung als AnxA5, was möglicherweise einen Einfluss auf die Größe der gebundenen Wasserhülle und damit auf den hydrodynamischen Durchmesser der Partikel hatte. Die Zunahme des hydrodynamischen Durchmessers durch die AnxA5-Beschichtung, hatte auch eine Zunahme der T2-Relaxivität zur Folge, während die T2-Relaxivität der M1234-VSOP, dessen Durchmesser geringer ist als der der AnxA5-VSOP, vergleichbar mit der T2-Relaxivität der unbeschichteten VSOP ($45 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) war. Die Relaxivität als Maß für die Wirksamkeit eines Kontrastmittels ist unter anderem abhängig von der Temperatur und der Viskosität sowie der Beweglichkeit der Teilchen [84, 86]. Durch die Beschichtung der VSOP mit AnxA5 stieg der Durchmesser der Partikel an, wodurch sich die Partikel langsamer bewegten und somit lokal einen stärkeren Einfluss auf die umliegenden Protonen hatten. Als superparamagnetische Substanzen sind VSOP-basierte Kontrastmittel typische T2- bzw. T2*-Kontrastmittel, welche im Gewebe statische, lokale Magnetfeld-Inhomogenitäten bewirken. Durch diese Inhomogenitäten dephasieren die Protonen schneller und die T2-Relaxationszeit wird kürzer [84, 86]. Durch die Beschichtung und die daraus resultierende langsamere Bewegung der Partikel änderte sich daher insbesondere die T2*-Relaxivität, während der Einfluss auf die T1-Relaxivität nur unwesentlich war.

Tabelle 4.4: Physikalische Eigenschaften von AnxA5-VSOP und M1234-VSOP. Die Größenmessungen wurden in 10 mM HEPES-Puffer (pH 7,4) und die Relaxivitätsmessungen (bei 0,94 T) in ^aWasser sowie ^cFCS durchgeführt. Die Messungen in FCS wurden zur Untersuchung der Partikelstabilität nach 24 Stunden wiederholt (Ergebnisse in Klammern). ^bDie Relaxivität der Partikel in Wasser wurde berechnet unter der Annahme, dass ein Partikel über 6500 Eisenatome verfügt.

(n = Anzahl der Syntheseansätze)

	AnxA5-VSOP	M1234-VSOP
hydrodynamischer Durchmesser [nm]	14,4 ± 2,3 (n = 5)	12,8 ± 0,9 (n = 2)
Proteinanzahl / VSOP	9,0 ± 0,9 (n = 5)	8,5 ± 0,7 (n = 2)
T1-Relaxivität (Fe) [$\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$] ^a	15	16
T2-Relaxivität (Fe) [$\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$] ^a	61	45
T1-Relaxivität (Partikel) [$\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$] ^b	98.000	104.000
T2-Relaxivität (Partikel) [$\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$] ^b	397.000	293.000
T1-Relaxivität (Fe) [$\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$] ^c	18 (18)	17 (17)
T2-Relaxivität (Fe) [$\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$] ^c	74 (74)	56 (59)

Stabilität der AnxA5-VSOP unter physiologischen Bedingungen

Neben den oben diskutierten Kriterien (Kontrolle der Beladungsdichte, Orientierung des Proteins) spielt für eine optimale Beschichtung auch die Stabilität der Bindung an der Partikeloberfläche eine wesentliche Rolle [102]. Verlieren die AnxA5-VSOP *in vivo* ihre Beschichtung ist die spezifische Anreicherung nicht mehr gewährleistet. Vielmehr kann die Ablösung von AnxA5 oder AnxA5 gebunden an Citrat eine Aggregation der Partikel bewirken, was insbesondere in der Blutbahn eine Unverträglichkeit zur Folge haben kann.

Die Größenmessungen der AnxA5-VSOP in Gegenwart verschiedener Ca^{2+} -Konzentrationen lieferten erste Hinweise auf die Partikelstabilität (Abbildung 4.16). Sowohl für die AnxA5-VSOP als auch für die M1234-VSOP wurde ein Größenanstieg der Partikel mit zunehmender Ca^{2+} -Konzentration beobachtet. Der Einfluss des Calciums auf die Größe der AnxA5-VSOP war wesentlich stärker und insbesondere bei den reinen CaCl_2 -Lösungen bewirkte der Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration eine Aggregation der Partikel. Der geringere Einfluss des Calciums auf die M1234-VSOP wurde auf die Mutationen in den Ca^{2+} -Bindungstaschen zurückgeführt. Während die Größenzunahme der AnxA5-VSOP durch eine Quervernetzung der AnxA5-Moleküle durch gebundenes Calcium hervorgerufen worden sein könnte [167], wurde die Größenzunahme der M1234-VSOP eher auf Wechselwirkungen von Ca^{2+} mit dem Citrat zurückgeführt. Der wesentlich geringere Einfluss von Ca^{2+} auf die Größenzunahme der M1234-VSOP stützt jedoch grundsätzlich die Annahme einer hohen Bedeckung der Partikeloberfläche, da die Beschichtung mit dem Protein eine Abschirmung der Oberfläche bewirkt und so die Wechselwirkungen von Ca^{2+} mit dem Citrat vermutlich stark abgeschwächt wurden.

Die Messungen in reinen CaCl_2 -Lösungen liefern Anhaltspunkte, können jedoch nicht alleine zur Bewertung der Stabilität herangezogen werden, da diese unter physiologischen Bedingungen nicht auftreten. Die eintretende Aggregation der AnxA5-VSOP in reinen, höher konzentrierten CaCl_2 -Lösungen bedeutet daher nicht, dass die Partikel für eine *in-vivo*-Anwendung ungeeignet sind. So wurden in Gegenwart weiterer physiologisch vorkommenden Ionen die Auswirkungen von Ca^{2+} abgeschwächt und die Größenzunahme der AnxA5-VSOP deutlich verringert. Die Ca^{2+} -Ionen standen dabei in Konkurrenz mit den anderen Ionen und die Ca^{2+} -Bindungstaschen wurden möglicherweise auch von diesen Ionen belegt. Da auch für die M1234-VSOP eine geringere Größenzunahme beobachtet wurde, kann davon ausgegangen werden, dass die Wechselwirkungen mit der Partikeloberfläche ebenfalls minimiert wurden. Ferner war die Größenzunahme der Partikel in Ca^{2+} -haltigem Bindungspuffer über einen Zeitraum von über drei Stunden im Vergleich zur Größenzunahme in reiner CaCl_2 -Lösung nur minimal. Im Falle der AnxA5-VSOP konnte zwar ein Trend beobachtet werden, berücksichtigt man in diesem Zusammenhang aber zusätzlich die Zirkulationsdauer der Partikel von 21 min (Kapitel 4.1.2.4. *In-vivo*-Untersuchung der Signalintensität halbwertszeit von

AnxA5-VSOP im Blut), so ist die beobachtete Größenzunahme im untersuchten Zeitraum vertretbar.

Die Relaxivitätsmessung der Partikel belegt die Stabilität der Partikel in FCS und Blut und weist so ebenfalls auf eine Anwendbarkeit *in vivo* hin. Da sich in allen Fällen eine stabile Suspension bildete, konnten die Relaxivitäten bestimmt werden (Tabelle 4.4). Für die AnxA5-VSOP wurde in FCS und Blut eine höhere T2-Relaxivität (R2) als in Wasser ermittelt. Der Grund für die höheren T2-Relaxivitäten liegt vermutlich in der Wechselwirkung der Partikel mit den in Serum und Blut befindlichen Proteinen bzw. deren Anlagerung [168]. Dies könnte zur Folge gehabt haben, dass sich die Partikel wie größere Partikel verhielten, sich infolgedessen langsamer bewegten und somit wieder einen stärkeren Einfluss auf die umliegenden Protonen hatten [168-171]. Ein ähnlicher Effekt konnte bereits durch die Bindung von AnxA5 an die Citrathülle beobachtet werden, wo sich bei gleichen Eisenkonzentrationen auch die Relaxivität der VSOP erhöhte. Auch für die M1234-VSOP konnte dieser Effekt in FCS und Blut beobachtet werden, wenn auch die gemessene T2-Relaxivität unter der T2-Relaxivität der Anx-VSOP lag. Da diese jedoch von vornherein schon einen kleineren Durchmesser hatten, überrascht dieses Ergebnis nicht.

Das Suspendieren der Partikel in reiner CaCl_2 -Lösung stellt hingegen dar, wie sich die Relaxationszeiten durch die eintretende Partikelaggregation ändern (Abbildung 4.19). Die Aggregation bewirkte zum einen, ähnlich wie die Anlagerung von Proteinen, dass die Partikel größer wurden und sich somit anders bewegten [78, 79]. Der Anstieg der Relaxationszeiten durch Zusammenlagerung und schließlich Präzipitation der Partikel ließ sich damit erklären, dass die Abstände zwischen den Partikeln zunahmen. Damit nahm auch der Anteil der Protonen zu, welche nicht durch das Magnetfeld der Partikel beeinflusst wurden und daher langsamer dephasierten [172]. Anhand der durchgeführten Messung in reinen CaCl_2 -Lösungen konnte die Aggregation und Präzipitation der AnxA5-VSOP gut beobachtet werden, während die in FCS suspendierten Proben sogar nach 24 Stunden nahezu die gleichen Relaxationszeiten aufwiesen, was auf die hohe Stabilität der Partikel unter den gegebenen Bedingungen hinweist.

Spezifische Bindung der AnxA5-VSOP an apoptotische Zellen (in vitro)

Ein weiteres Kriterium ist der Erhalt der Funktion der Reaktionspartner. Die magnetischen Eigenschaften der VSOP blieben nach der Beschichtung mit AnxA5 (Kapitel 4.1.2.2. Stabilitätsuntersuchungen der AnxA5-VSOP) erhalten. Einen stärkeren Einfluss hat die Konjugation jedoch möglicherweise auf die Aktivität des Proteins. In der vorgestellten Synthese ist die Ausrichtung des AnxA5 auf der Partikeloberfläche nicht kontrollierbar. Da die Synthese nicht stöchiometrisch verläuft, ist außerdem nicht vorhersagbar wie viele Lysine des AnxA5 und letztlich wie viele AnxA5-Moleküle an der Bindung beteiligt sind. Sowohl die falsche Ausrich-

tung als auch die Reaktion mit zuvielen Lysinen, was wiederum eine Konformationsänderung des AnxA5 bewirken kann, kann einen Aktivitätsverlust des AnxA5 nach sich ziehen. Das kann wiederum zur Folge haben, dass die Partikel gar nicht mehr oder unspezifisch binden. Eine zu geringe oder zu hohe Beladung kann ferner denselben Effekt haben.

Die Ergebnisse der Zellversuche eigneten sich zur Untersuchung der spezifischen Bindung der AnxA5-VSOP an apoptotische Zellen (Abbildung 4.21). Auch wenn sie keine direkten Informationen über die Ausrichtung des Proteins auf der Partikeloberfläche lieferten, konnte aus ihnen geschlossen werden, dass die Konjugation des Proteins keinen kompletten Aktivitätsverlust bewirkte und sich genügend funktionelles AnxA5 auf den VSOP befand, um wie gewünscht spezifisch an apoptotische Zellen zu binden. Dies wurde deutlich durch die unterschiedliche Signalverminderung bei den Zellproben, welche mit AnxA5-VSOP inkubiert wurden und über einen unterschiedlichen Anteil apoptotischer Zellen verfügten. Bestätigt wurde dies durch den Vergleich der Zellproben ohne Partikel sowie der Zellproben, welche mit der Kontrollsonde M1234-VSOP inkubiert wurden, bei denen in allen Fällen eine deutlich geringere Signalverminderung auftrat. Die Tatsache, dass sich der Versuch nicht eignete, um eine Aussage über die Ausrichtung des Proteins zu treffen, minderte die Ergebnisse nicht, da AnxA5, welches über die konvexe Seite an das Partikel gebunden wurde, die spezifische Bindung der übrigen AnxA5 nicht stören sollte.

Die ermittelten T2*-Relaxationszeiten (Tabelle 4.3) bestätigten ebenfalls die spezifische Bindung der AnxA5-VSOP an apoptotische Zellen. Die ermittelte T2*-Relaxationszeit nahm nach Inkubation mit AnxA5-VSOP mit zunehmender Anzahl apoptotischer Zellen ab und lag in jedem Fall niedriger als bei den Zellen, welche mit M1234-VSOP inkubiert wurden (Abbildung 4.21d). Die geringen unspezifischen Wechselwirkungen der Kontrollsonde lassen erneut den Schluss zu, dass die Partikeloberfläche einen hohen Bedeckungsgrad aufweist. Es war somit durch Inkubation mit AnxA5-VSOP möglich, bereits bei einem geringen Unterschied in der Anzahl apoptotischer Zellen, einen deutlichen Unterschied der Relaxationszeit zu messen. Insbesondere für *in-vivo*-Anwendungen, wie Beobachtung und Evaluation der Tumorthherapie, ist dies von Bedeutung.

Signalintensitätshalbwertszeit der AnxA5-VSOP im Blut und spezifische Bindung der AnxA5-VSOP an apoptotische Zellen (in vivo)

Die durchgeführten *in-vivo*-Untersuchungen stellen erste Ergebnisse dar und müssen in Zukunft durch weitere Messungen (Kontrollen, Referenzen, Messung zu früheren Zeitpunkten) ergänzt werden. Trotzdem lieferten sie erste Anhaltspunkte, die auf eine erfolgreiche *in-vivo*-Anwendbarkeit hinweisen.

Ziel der Arbeit war es unter anderem, eine Sonde für die Apoptose-Bildgebung mit einer verbesserten Bioverfügbarkeit herzustellen. Dies wurde versucht, indem mit den VSOP wesentlich kleinere Eisenoxidnanopartikel, als bisher erfolgreich *in vivo* angewandt, funktionalisiert wurden. Sehr erfolgreich konnten z. B. die Eisenoxidpartikel CLIO (*cross-linked iron oxides*) mit Annexin A5 funktionalisiert und zur Apoptose-Bildgebung eingesetzt werden [65, 67, 69-71]. Mit einer Größe von ca. 50 nm sind die AnnexinA5-CLIO jedoch relativ groß. Die Halbwertszeit der Partikel von 2,7 Stunden erlaubt zudem erst eine Bildgebung nach 3-6 Stunden, da für einen guten Kontrast ein großer Teil der Partikel aus dem Blut ausgeschieden sein muss [173]. Überträgt man das auf den Menschen wäre die Halbwertszeit noch länger, wodurch sich die Anwendung der Sonde in der Klinik erschwert [174]. Für die hergestellten AnxA5-VSOP wurde mit 21 min eine wesentlich kürzere Signalintensitätshalbwertszeit im Blut ermittelt (Abbildung 4.23). Eine schnellere Ausscheidung der AnxA5-VSOP könnte, bei ausreichender Anreicherung im Zielgewebe, früher in einem ausreichenden Kontrast resultieren, was wiederum eine frühere Messung erlauben würde.

Die Untersuchung der spezifischen Anreicherung der AnxA5-VSOP in einem Ischämie-Reperfusion-Modell gründete auf der erfolgreichen Anwendung von AnnexinA5-CLIO im gleichen Modell [173]. Diese reichern sich spezifisch im geschädigten Myokard an und ermöglichen ab drei Stunden nach Partikelgabe eine sensitive Apoptose-Bildgebung mittels MRT. Die Untersuchung der AnxA5-VSOP in diesem Modell zeigte, dass unter den gleichen Bedingungen ebenfalls eine Signalverminderung im geschädigten Myokard auftrat, während dies bei den Kontrollmäusen (keine Partikelgabe bzw. Injektion der Kontrollsonde) nicht der Fall war (Abbildung 4.24). Der Vergleich der Daten legt eine spezifische Anreicherung der Partikel nahe, muss jedoch in weiteren Untersuchungen belegt werden.

Inwiefern die AnxA5-VSOP aufgrund ihrer Größe tatsächlich eine verbesserte Bioverfügbarkeit aufweisen, muss ebenfalls in fortführenden Arbeiten untersucht werden. Die *in-vivo*-Untersuchungen zeigen jedoch, dass die hergestellten Partikel grundsätzlich geeignet sind und die kurze Halbwertszeit von nur 21 min scheint für die Partikelanreicherung ausreichend zu sein. Die AnxA5-VSOP zeigen eventuell aufgrund des kleineren Durchmessers (14 nm vs. 50 nm), wie beabsichtigt, eine schnellere Anreicherungskinetik. Darüber hinaus verfügen die AnxA5-VSOP trotz der kleineren Größe über eine höhere T2-Relaxivität pro Eisen und insbesondere pro Partikel (ca. $400.000 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ vs. $100.000 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) im Vergleich zu AnnexinA5-CLIO [70], was eine geringere Dosis an Kontrastmittel erlauben könnte.

4.2. Protease-spezifische Eisenoxidnanopartikel (PSOP)

Die Synthese protease-spezifischer Eisenoxidnanopartikel (*protease specific iron oxide nanoparticles*, PSOP) erfolgte durch Bindung von Peptid-PEG-Konjugaten an die Citrathülle der VSOP. Es wurden fünf verschiedene Peptid-PEG-Konjugate zur Beschichtung der VSOP hergestellt (Tabelle 4.5). Dabei wurde die Stabilität und enzymatische Aktivierbarkeit der resultierenden PSOP infolge der unterschiedlichen Aminosäuresequenzen (argininreich vs. lysinreich) sowie der Anzahl der PEG-Kopplungsstellen verglichen. Prinzipiell wurden zwei Wege zur Beschichtung der VSOP untersucht:

- (1) Elektrostatische Bindung: Die Peptid-PEG-Konjugate wurden über ihre polykationische Peptidsequenz elektrostatisch an die negativ geladene Citrathülle gebunden. Die hier eingesetzten Peptide verfügten über eine Argininkette und wurden über freie Aminogruppen mit NHS-modifiziertem PEG (NHS-PEG5000, $M \approx 5000$ g/mol) zum Peptid-PEG-Konjugat umgesetzt.
- (2) Kovalente Bindung: Die Peptid-PEG-Konjugate wurden über die primären Aminogruppen einer Polylysinsequenz kovalent an die Carboxygruppen der Citrathülle gebunden. Die hier verwendeten Peptide verfügten zusätzlich über Cystein, so dass Maleimid-modifiziertes PEG (Mal-PEG5000, $M \approx 5000$ g/mol) mit freien Thiolen zu den Peptid-PEG-Konjugaten reagieren konnte.

Die enzymatische Aktivierung der PSOP ist schematisch in Abbildung 4.27 dargestellt. Das Modell wurde mit Hilfe des Programms *PyMOL* erstellt und dient dem besseren Verständnis der Funktionsweise der PSOP. Der mittels dynamischer Lichtstreuung gemessene hydrodynamische Durchmesser der PSOP diente dabei als Hilfestellung bei der Erstellung des Modells, genauer bei der Anordnung der PEG-Ketten um den Partikelkern. Die Größenmessung liefert jedoch einen Durchschnittswert und lässt keine Aussage über die tatsächliche Anordnung der beweglichen PEG-Ketten an der Partikeloberfläche zu. Die Darstellung der PSOP und ihre Funktionsweise darf daher nur als Modell verstanden werden und stellt nicht die Realität dar.

Tabelle 4.5: Übersicht der Aminosäuresequenzen der eingesetzten Peptide und der daraus hergestellten Peptid-PEG-Konjugate. Die Erkennungssequenz für MMP-9 ist gelb markiert. Die eingesetzten Peptide trugen zur einfacheren Charakterisierung einen Fluoreszenzfarbstoff (Fluorescein, grün). Die argininreichen Peptide P2, P3 und P4 dienten der elektrostatischen Beschichtung der VSOP und wurden über den N-Terminus mit NHS-PEG5000 zur Reaktion gebracht. Die Peptide P3 und P4 verfügten zusätzlich über eine Lysinseitenkette, welche ebenfalls PEGyliert wurde. Die lysinreichen Peptide P5 und P6 dienten der kovalenten Beschichtung der VSOP und wurden über die Cysteinseitenkette am C-Terminus mit Mal-PEG5000 zur Reaktion gebracht (siehe auch Kapitel 4.2.1. Synthese und Charakterisierung der Peptid-PEG-Konjugate). Fluo: Fluorescein.

Aminosäuresequenz des eingesetzten Peptids	Bezeichnung des Peptid-PEG-Konjugats	Zweck der Variation ausgehend von K2
GG PRQ ITAGK (Fluo) GGGGR RRRRG RRRRR (P2)	MMP(Arg)-PEG5000 (K2)	-
GKGG RQITA GK(Fluo)GGG GRRRR RGRRR RR (P3)	MMP(Arg)-(PEG5000) ₂ (K3)	Verbesserung der sterischen Stabilisierung und der <i>stealth</i> -Eigenschaften
GKGG RQITA GK(Fluo)GGG GRRRR RGRRR RRC-Dimer (P4)	(MMP(Arg)-(PEG5000) ₂)- Cys-Dimer (K4)	stärkere Bindung des Konjugats an Citrathülle durch kumulative Bindung Verbesserung der sterischen Stabilisierung und der <i>stealth</i> -Eigenschaften
KKKKK KKKKK GGGG RQITA GK(Fluo)GC (P5)	MMP(Lys)-PEG5000 (K5)	stärkere Bindung des Konjugats an Citrathülle durch kovalente Bindung
RKKRK KRKKR KKRGG GGGG RQITA GK(Fluo)GC (P6)	MMP(LysArgGly)-PEG5000 (K6)	stärkere Bindung des Konjugats an Citrathülle durch kovalente Bindung Erhalt positiver Ladungen nach kovalenter Bindung des Konjugats

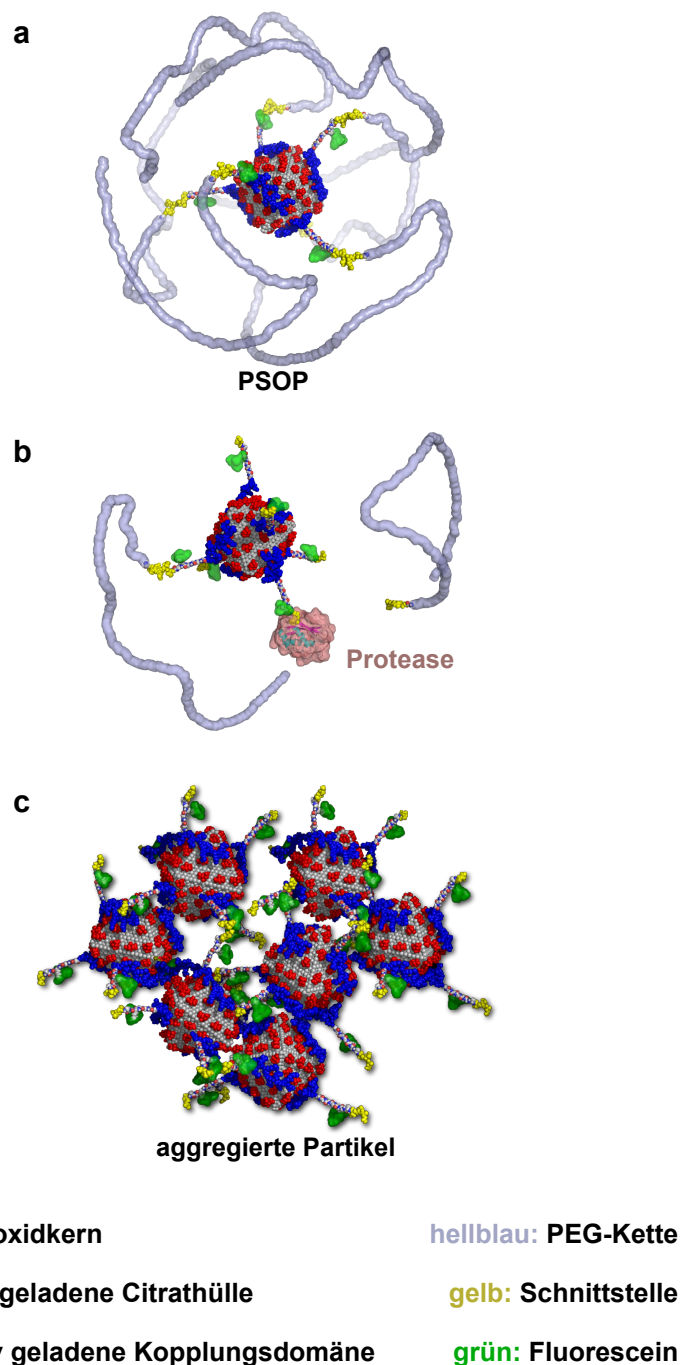


Abbildung 4.27: Schematische Darstellung und Funktionsweise der PSOP*. (a) **Modell der PSOP.** Die Eisenoxidkerne mit einer negativ geladenen Citrathülle sind durch die Beschichtung mit Peptid-PEG-Konjugaten sterisch stabilisiert. Neben der polykationischen Domäne verfügt das Peptid über den Farbstoff Fluorescein und eine Schnittstelle für die Enzyme MMP-2 und -9. (b) **Aktivierung der PSOP.** Gelangen die PSOP ins Zielgewebe, werden die Peptide enzymatisch gespalten, wobei die PSOP die stabilisierenden PEG-Ketten verlieren und eine gemischt geladene Partikeloberfläche freigelegt wird. (c) **Aggregation der Partikel.** Durch die positiv und negativ geladene Oberfläche sowie den Verlust der sterischen Stabilisierung aggregieren die Partikel, wodurch die T2*-Relaxivität und damit der Kontrasteffekt zunimmt.

*Die Abbildung dient dem besseren Verständnis der Funktionsweise der PSOP und stellt nicht die tatsächliche Anordnung der PEG-Ketten dar.

4.2.1. Synthese und Charakterisierung der Peptid-PEG-Konjugate

4.2.1.1. NHS-Kopplung

Für die elektrostatische Beschichtung wurden drei verschiedene argininreiche Peptide (P2, P3, P4) mit NHS-PEG5000 zu Peptid-PEG-Konjugaten (K2, K3, K4) umgesetzt. Die PEGylierung der Peptide erfolgte in allen drei Fällen über den N-Terminus des jeweiligen Peptids. Bei zwei Peptiden wurde zusätzlich eine weitere PEG-Kette über eine Lysinseitenkette eingebracht, mit dem Ziel der Verbesserung der sterischen Stabilisierung sowie der *stealth*-Eigenschaften der daraus hergestellten PSOP. Die Sequenzen der eingesetzten Peptide und die Bezeichnungen der daraus hergestellten Konjugate sind in Tabelle 4.5 aufgeführt.

Die Reaktion der Peptide P2, P3 und P4 über primäre Aminogruppen mit NHS-PEG5000 ist in Abbildung 4.28a beispielhaft für MMP(Arg)-PEG5000 (K2) gezeigt. Die PEGylierung der Peptide erfolgte in einem HEPES-Puffer (pH 7,4) über 18 Stunden bei 4 °C. Die Synthese von MMP(Arg)-PEG5000 (K2) und MMP(Arg)-(PEG5000)₂ (K3) (Abbildung 4.28b) erfolgte mit 20-fachem molarem Überschuss an NHS-PEG5000. Das Konjugat (MMP(Arg)-(PEG5000)₂)-Cys-Dimer (K4) (Abbildung 4.28c) wurde mit einem 40-fachen molaren Überschuss an NHS-PEG5000 zur Reaktion gebracht. Die Konjugate wurden über Größenausschlusschromatographie gereinigt und über HPLC und SDS-PAGE charakterisiert. Zusätzlich wurden die Konjugate MMP(Arg)-PEG5000 (K2) und MMP(Arg)-(PEG5000)₂ (K3) mittels MALDI/TOF-MS analysiert. Die Ausbeuten der einzelnen Konjugate sind in Tabelle 4.6 zusammengefasst.

Tabelle 4.6: Ausbeuten der synthetisierten Konjugate (bezogen auf eingesetzte Peptidmenge).

	Menge umgesetztes Peptid [%]	Ausbeute nach Reinigung [%]
MMP(Arg)-PEG5000 (K2)	96	42
MMP(Arg)-(PEG5000) ₂ (K3)	93	28
(MMP(Arg)-(PEG5000) ₂)- Cys-Dimer (K4)	100	41

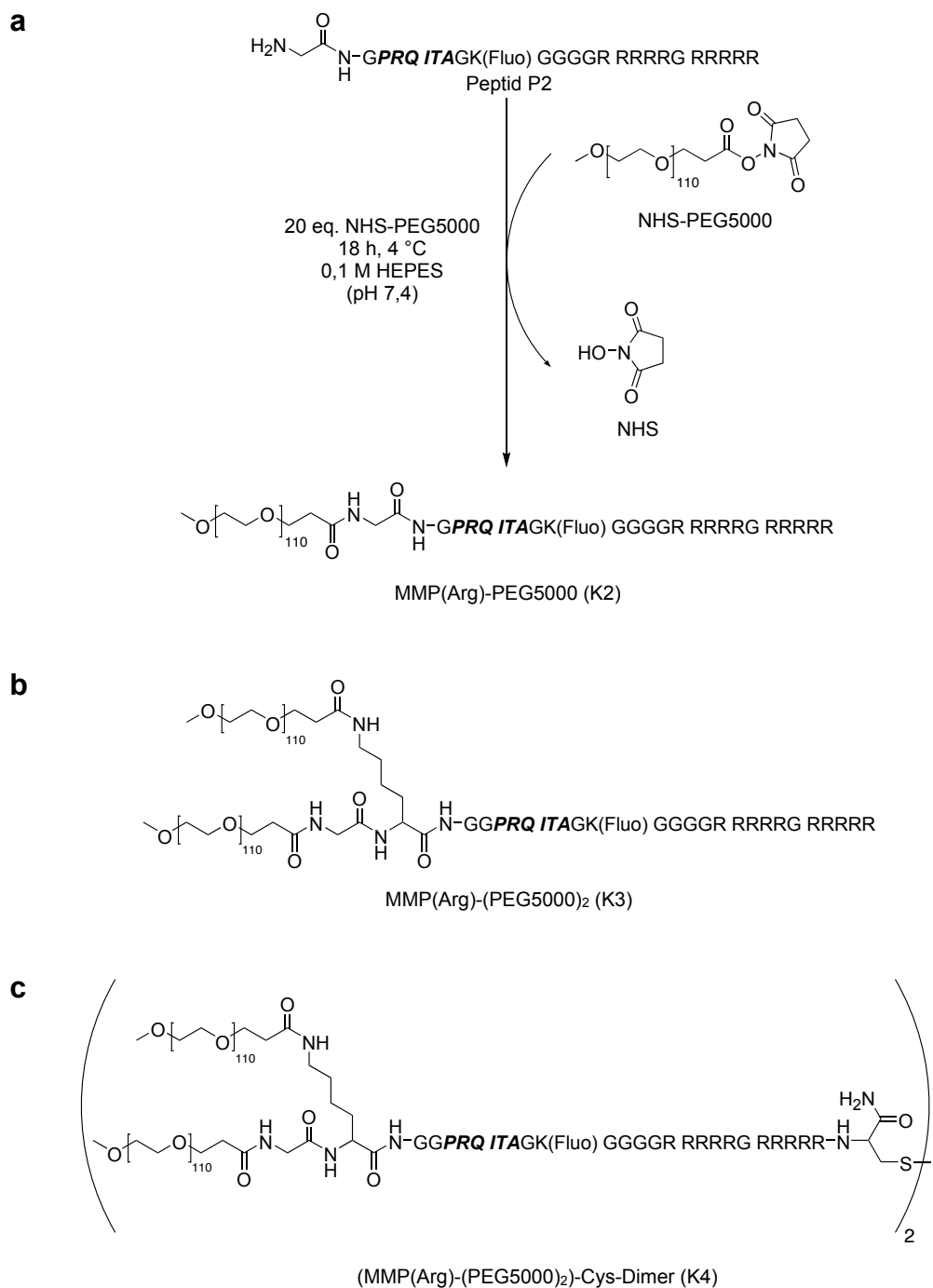


Abbildung 4.28: Umsetzung des Peptids P2 über die primäre Aminogruppe mit NHS-PEG5000 zu MMP(Arg)-PEG5000 (K2) (a). Die Konjugate MMP(Arg)-(PEG5000)₂ (K3) (b) und (MMP(Arg)-(PEG5000)₂-Cys-Dimer (K4) (c) wurden analog hergestellt. Beim Dimer (K4) wurde lediglich der Überschuss an NHS-PEG5000 verdoppelt.

Charakterisierung von MMP(Arg)-PEG5000 (K2) und MMP(Arg)-(PEG5000)₂ (K3)

Die Chromatogramme der Größenausschlusschromatographie zur Abtrennung der Konjugate MMP(Arg)-PEG5000 (K2) bzw. MMP(Arg)-(PEG5000)₂ (K3) von unreaktiertem Peptid und überschüssigem NHS-PEG5000 sind in Abbildung 4.29 gezeigt. Das Konjugat eluierte jeweils zuerst, gefolgt von NHS-PEG5000, welches bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280$ nm stark absorbierte. Die Zuordnung der Fraktionen erfolgte über den Farbstoff Fluorescein (Gelbfärbung der Substanzen).

Die Ergebnisse der HPLC zeigen, dass in den Reaktionsansätzen in beiden Fällen noch unreaktiertes Peptid enthalten war, welches bei einer Retentionszeit von $t_{\text{Ret}}(\text{P2}) = 6,2$ min (Abbildung 4.30a) bzw. $t_{\text{Ret}}(\text{P3}) = 5,8$ min (Abbildung 4.30c) eluierte. Nach der Reinigung der Konjugate war in den HPLC-Chromatogrammen jeweils nur noch ein Peak zu sehen (Abbildung 4.30b, d), der dem jeweiligen Konjugat zugeordnet wurde ($t_{\text{Ret}}(\text{K2}) = 9,4$ min; $t_{\text{Ret}}(\text{K3}) = 10,0$ min). Die gesammelten Fraktionen, welche nach dem HPLC-Chromatogramm nachweislich frei an unreaktiertem Peptid waren, wurden vereinigt.

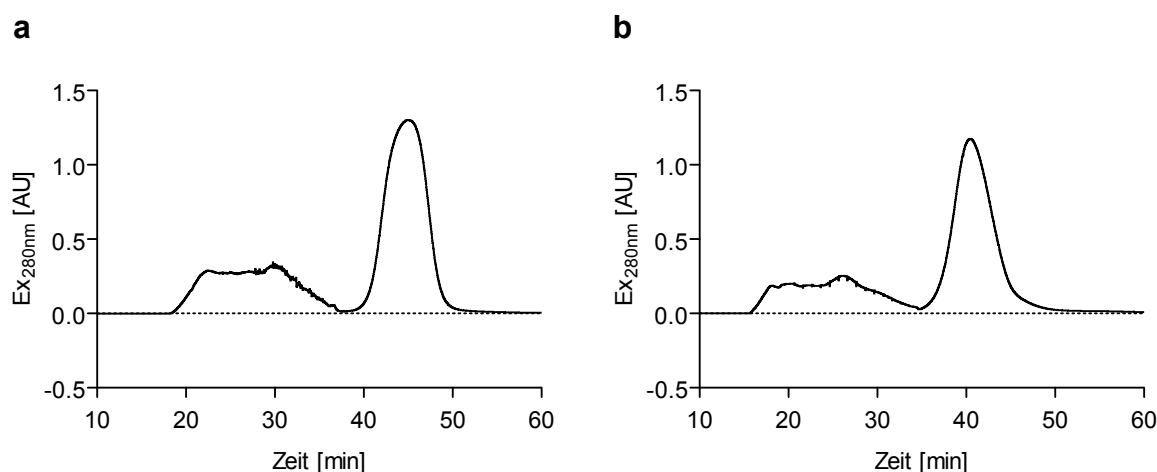


Abbildung 4.29: Größenausschlusschromatogramm der Reinigung von MMP(Arg)-PEG5000 (K2) (a) und MMP(Arg)-(PEG5000)₂ (K3) (b).

(a) $t_{\text{Ret}}(\text{K2}) = 20\text{-}35$ min; $t_{\text{Ret}}(\text{NHS-PEG5000}) = 40\text{-}50$ min

(b) $t_{\text{Ret}}(\text{K3}) = 15\text{-}35$ min; $t_{\text{Ret}}(\text{NHS-PEG5000}) = 35\text{-}45$ min.

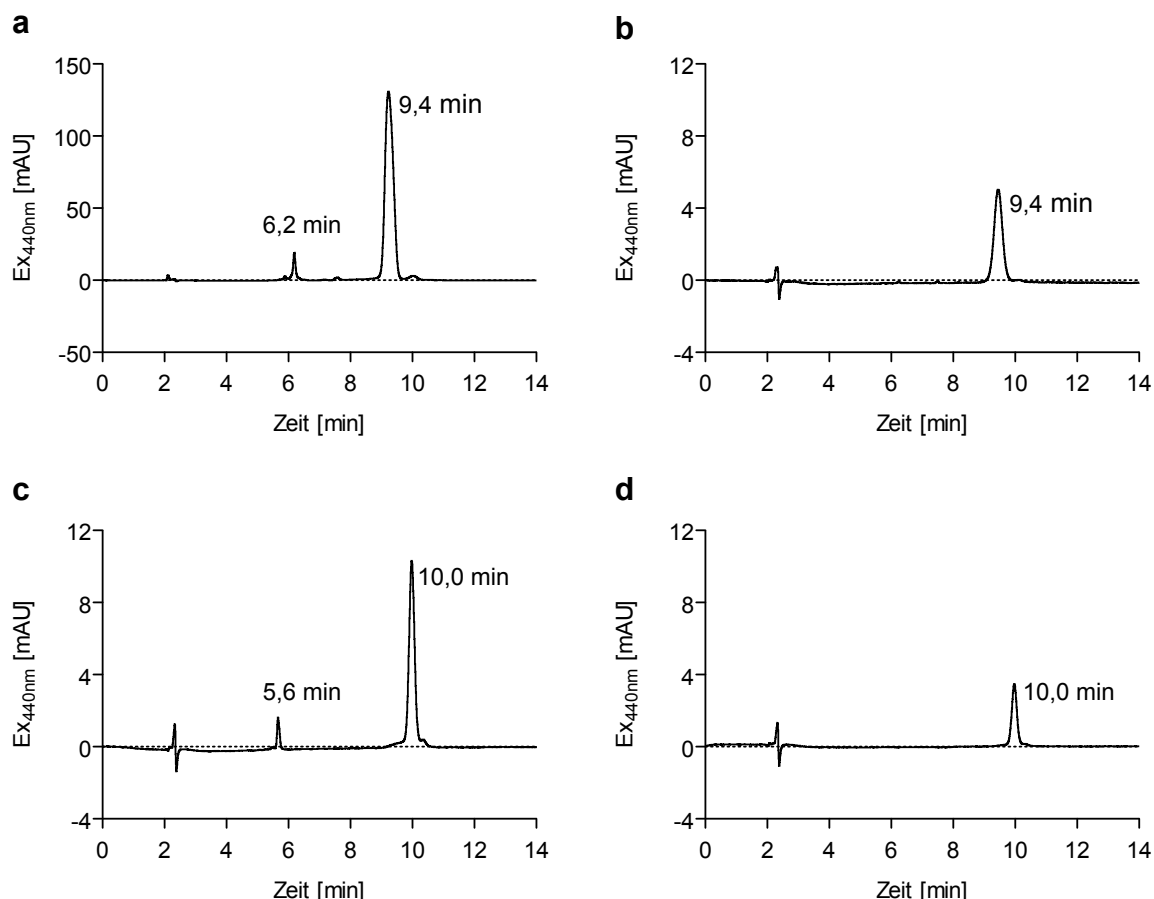


Abbildung 4.30: HPLC-Chromatogramme des Reaktionsansatzes (a, c) und des gereinigten MMP(Arg)-PEG5000 (K2) (b) bzw. MMP(Arg)-(PEG5000)₂ (K3) (d).

(a), (b) $t_{\text{Ret}}(\text{P2}) = 6,2 \text{ min}$; $t_{\text{Ret}}(\text{K2}) = 9,4 \text{ min}$

(c), (d) $t_{\text{Ret}}(\text{P3}) = 5,6 \text{ min}$ $t_{\text{Ret}}(\text{K3}) = 10,0 \text{ min}$.

Die zusätzliche Analyse der Konjugate MMP(Arg)-PEG5000 (K2) und MMP(Arg)-(PEG5000)₂ (K3) mittels SDS-PAGE belegte ebenfalls die erfolgreiche Abtrennung des unreaktierten Peptids P2 bzw. P3 (Abbildung 4.31). Für die Synthese von MMP(Arg)-PEG5000 (K2) wurde ein Peptid mit einer molaren Masse von 3220 g/mol eingesetzt. Durch die PEGylierung erhöhte sich die molare Masse auf durchschnittlich 8220 g/mol. Das Laufverhalten des Peptids P2 (Abbildung 4.31, Spur 2) und des Konjugats MMP(Arg)-PEG5000 (K2) (Abbildung 4.31, Spur 4) gab jedoch nicht die tatsächlichen Größenverhältnisse wieder. Vielmehr wanderten diese langsamer durch das Gel als Proteine vergleichbarer Größe. Das Laufverhalten des Peptids P2 entsprach in etwa dem des Größenmarkers bei 10 kDa und das Laufverhalten des Konjugats MMP(Arg)-PEG5000 (K2) entsprach dem des Größenmarkers bei 15 kDa. Der gleiche Effekt war für das Konjugat MMP(Arg)-(PEG5000)₂ (K3) mit einer molaren Masse von durchschnittlich 13430 g/mol (Abbildung 4.31, Spur 5) und dem dazugehörigen Peptid P3 ($M = 3430 \text{ g/mol}$) (Abbildung 4.31, Spur 3) zu beobachten. Das Peptid P3 wanderte zwischen den Größenmarkern mit 10 kDa und 15 kDa. Das Konjugat K3 wanderte ähnlich wie der Größenmarker bei 25 kDa. Das abweichende Laufverhalten der Peptide und Konjugate

von dem der Größenmarker wurde auf die stark polykationische Aminosäuresequenz der Peptide zurückgeführt. Ferner erfolgte beim ungeladenen PEG keine Maskierung durch SDS.

Aufgrund des abweichenden Laufverhaltens der synthetisierten Konjugate, wurden exemplarisch von den Konjugaten MMP(Arg)-PEG5000 (K2) und MMP(Arg)-(PEG5000)₂ (K3) MALDI/TOF-Massenspektren aufgenommen (Abbildung 4.32). Für das Konjugat MMP(Arg)-PEG5000 (K2) konnte eine Massenverteilung um 8000 g/mol und für das Konjugat MMP(Arg)-(PEG5000)₂ (K3) um 13000 g/mol nachgewiesen werden. Für die weiteren Konjugate wurde auf den Nachweis mittels MALDI/TOF-MS verzichtet und die Ergebnisse der Konjugate MMP(Arg)-PEG5000 (K2) und MMP(Arg)-(PEG5000)₂ (K3) aus HPLC und SDS-PAGE dienten als Referenz.

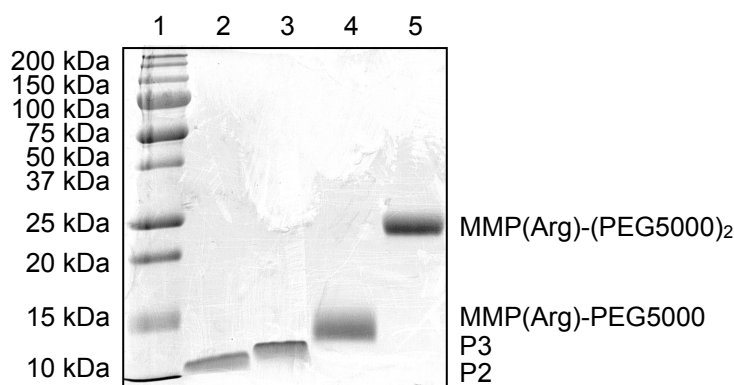


Abbildung 4.31: SDS-PAGE von MMP(Arg)-PEG5000 (K2) und MMP(Arg)-(PEG5000)₂ (K3). (1) Proteingrößenmarker (2) P2 (3) P3 (4) K2, gereinigt (5) K3, gereinigt. Die eingesetzten Peptide liefen knapp über der Größenbande von 10 kDa. Die hergestellten Konjugate liefen bei ca. 15 kDa (MMP(Arg)-PEG5000) bzw. bei 25 kDa (MMP(Arg)-(PEG5000)₂). In beiden Fällen war nach der Reinigung kein freies Peptid mehr nachweisbar.

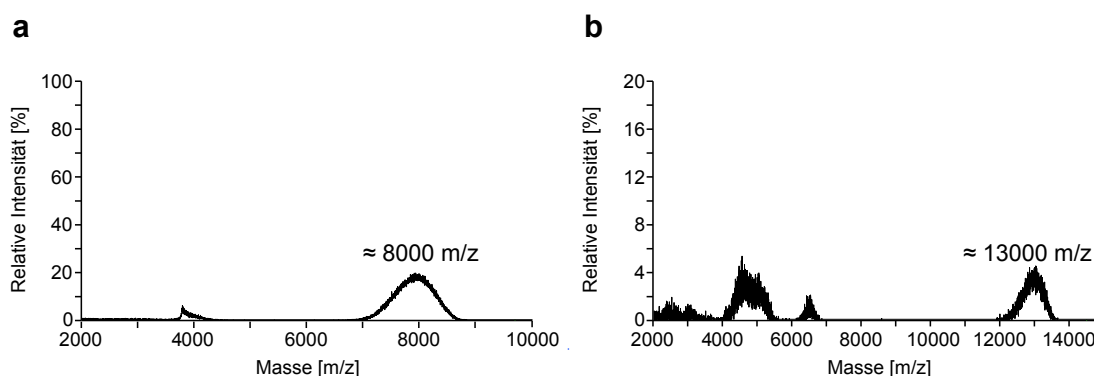


Abbildung 4.32: MALDI/TOF-Massenspektren von MMP(Arg)-PEG5000 (K2) (a) und MMP(Arg)-(PEG5000)₂ (K3) (b).

(a) $M_{\text{ber}}(\text{K2}) = 8220 \text{ g/mol}$ (Durchschnitt); $M_{\text{gef}}(\text{K2}) \approx 8000 \text{ g/mol}$

(b) $M_{\text{ber}}(\text{K3}) = 13430 \text{ g/mol}$ (Durchschnitt); $M_{\text{gef}}(\text{K3}) \approx 13000 \text{ g/mol}$.

Charakterisierung von (MMP(Arg)-(PEG5000)₂)-Cys-Dimer (K4)

Das Größenausschlusschromatogramm (Abbildung 4.33) sowie das HPLC-Chromatogramm (Abbildung 4.34) belegen die Umsetzung des Peptids P4 und die erfolgreiche Reinigung des Konjugats (MMP(Arg)-(PEG5000)₂)-Cys-Dimer (K4). Das eingesetzte Peptid P4 hatte in der HPLC eine Retentionszeit von $t_{\text{Ret}}(\text{P4}) = 6,2$ min und das hergestellte Konjugat eluierte bei einer Retentionszeit von $t_{\text{Ret}}(\text{K4}) = 10,3$ min. Die Ergebnisse der SDS-PAGE zeigen ebenfalls die Umsetzung des Peptids P4 zum Konjugat K4 (Abbildung 4.35). Das eingesetzte Peptid P4 hatte eine molare Masse von 7066 g/mol und das Konjugat K4 hatte nach Reaktion mit vier NHS-PEG5000 eine molare Masse von ca. 27000 g/mol. Das Peptid P4 wanderte zwischen 15 und 20 kDa (Abbildung 4.35, Spur 2) und das Konjugat K4 wanderte zwischen 50 und 75 kDa (Abbildung 4.35, Spur 4). Um sicherzustellen, dass das gewünschte Konjugat K4 mit vier PEG-Ketten hergestellt wurde, wurde das Konjugat K4 mit DTT behandelt, um die Disulfidbrücke zu spalten, und ebenfalls mittels SDS-PAGE analysiert. Bei vollständiger Reaktion des Peptids P4 mit vier Ketten, entsteht aus der Spaltung ein Konjugat mit zwei PEG-Ketten und einer molaren Masse von ca. 13500 g/mol. Das gespaltene Peptid (Abbildung 4.35, Spur 3) sowie das gespaltene Konjugat (Abbildung 4.35, Spur 5) wanderten erwartungsgemäß schneller als das jeweilige Dimer. Das Laufverhalten des gespaltenen Konjugats entsprach dabei dem des vergleichbaren Konjugats MMP(Arg)-(PEG5000)₂ (K3) (Abbildung 4.31, Spur 5). Die starke Bande bei 75 kDa in Spur 4 wurde folglich Konjugat mit vier PEG-Ketten zugeordnet und die schwache Bande bei 50 kDa wurde Konjugat mit nur drei PEG-Ketten zugeordnet.

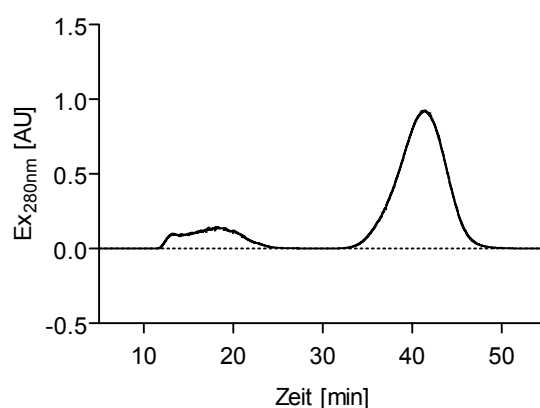


Abbildung 4.33: Größenausschlusschromatogramm der Reinigung des Konjugats (MMP(Arg)-(PEG5000)₂)-Cys-Dimer (K4).

$t_{\text{Ret}}(\text{K4}) = 10\text{-}25$ min; $t_{\text{Ret}}(\text{NHS-PEG5000}) = 35\text{-}45$ min.

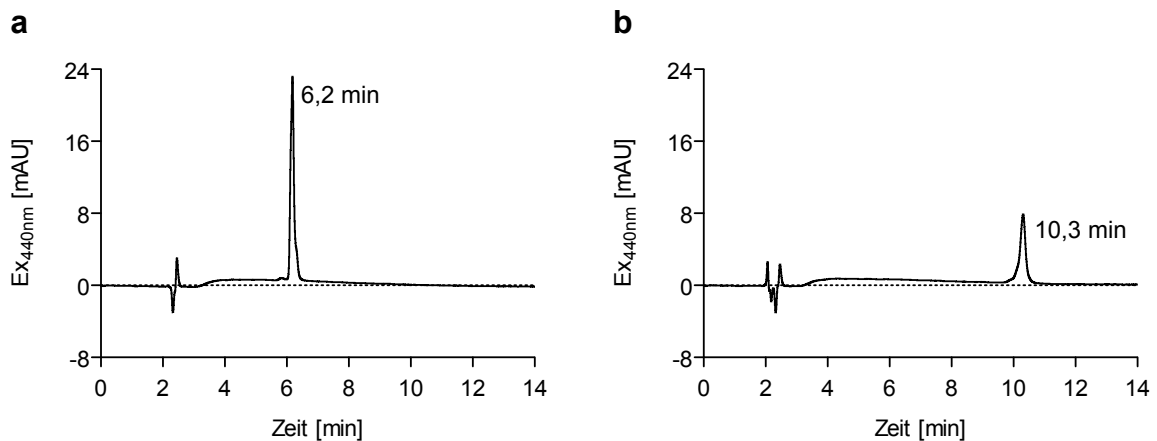


Abbildung 4.34: HPLC-Chromatogramme des eingesetzten Peptids P4 (a) und des gereinigten (MMP(Arg)-(PEG5000)₂)-Cys-Dimer (K4) (b).

(a) $t_{\text{Ret}}(\text{P4}) = 6,2 \text{ min}$

(b) $t_{\text{Ret}}(\text{K4}) = 10,3 \text{ min.}$

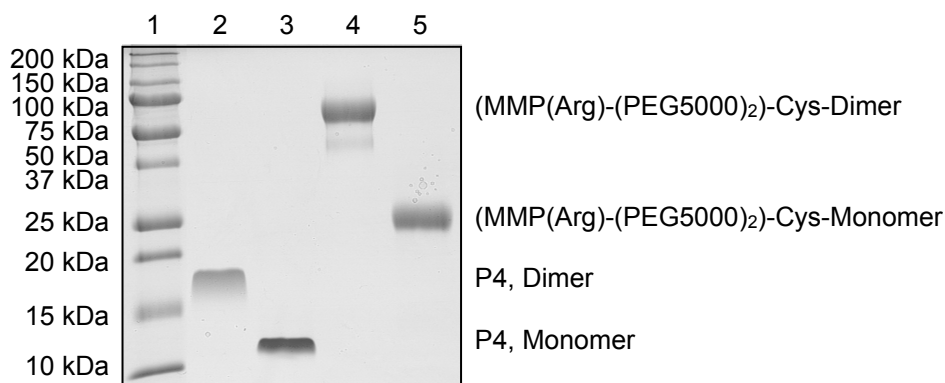


Abbildung 4.35: SDS-PAGE des Konjugats (MMP(Arg)-(PEG5000)₂)-Cys-Dimer (K4) vor und nach DTT-Behandlung. (1) Proteingrößenmarker (2) P4, ohne DTT (3) P4, mit DTT (4) K4, ohne DTT (5) K4, mit DTT. Das Peptid P4 lief vor der DTT-Behandlung zwischen der Größenbande von 15 und 20 kDa und das Konjugat K4 lief zwischen 50 und 75 kDa. Nach der DTT-Behandlung wanderte das gesplattene Peptid über der Größenbande von 10 kDa und das gesplattene Konjugat lief ungefähr bei der Größenbande von 25 kDa.

4.2.1.2. Maleimid-Kopplung

Für die kovalente Beschichtung wurde ein Peptid mit einer Lysin-Kopplungsdomäne (P5) und eins mit einer Lysin-Arginin-Kopplungsdomäne (P6) mit Maleimid-PEG5000 (Mal-PEG5000) zum Peptid-PEG-Konjugat (K5, K6) umgesetzt. Die Lysine dienten der kovalenten Anbindung der Konjugate an der Citrathülle. Die Arginine dienten dem Erhalt positiver Ladungen nach Reaktion mit der Citrathülle. Die PEGylierung der Peptide erfolgte in beiden Fällen über Cystein am C-Terminus. Die Sequenzen der eingesetzten Peptide und die Bezeichnungen der daraus hergestellten Konjugate sind in Tabelle 4.5 aufgeführt.

Die Reaktion der Peptide P5 (M = 2898 g/mol) und P6 (M = 3536 g/mol) über die freie Thiolgruppe des Cysteins mit Mal-PEG5000 ist in Abbildung 4.36 beispielhaft für MMP(Lys)-PEG5000 (K5) dargestellt. Die PEGylierung der Peptide P5 und P6 erfolgte in einem HEPES-Puffer (pH 7,0) bei 4 °C über zwei Stunden. Die Synthese der Konjugate K5 und K6 erfolgte im Verhältnis 1:(1-0,75) von Peptid zu Mal-PEG5000. Die Abtrennung des unreaktierten Peptids erfolgte im Anschluss an die Reaktionszeit über Größenausschlusschromatographie. Die Konjugate wurden mittels HPLC und SDS-PAGE charakterisiert. Die Ausbeuten der hergestellten Konjugate sind in Tabelle 4.7 aufgeführt.

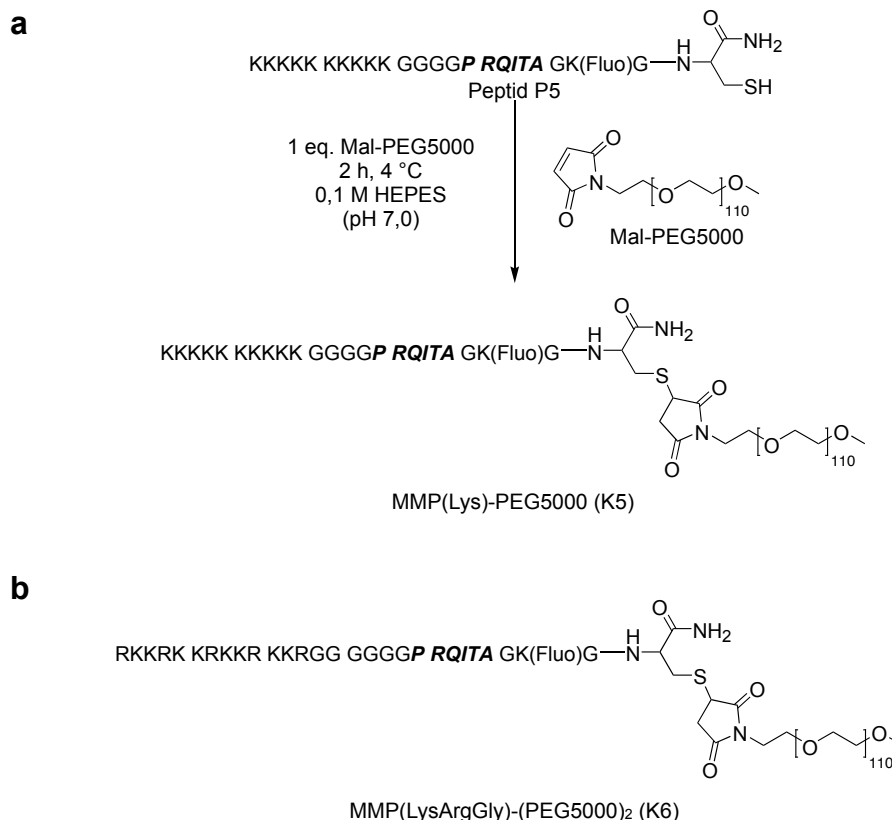


Abbildung 4.36: Umsetzung des Peptids P5 über die freie Thiolgruppe des Cysteins mit Mal-PEG5000 zu MMP(Lys)-PEG5000 (K5) (a). Das zweite Konjugat MMP(LysArgGly)-PEG5000 (K6) (b) wurde analog, jedoch mit nur 0,75 eq. Mal-PEG5000 hergestellt.

Tabelle 4.7: Ausbeuten der synthetisierten Konjugate (bezogen auf eingesetzte Peptidmenge).

	Menge umgesetztes Peptid [%]	Ausbeute nach Reinigung [%]
MMP(Lys)-PEG5000 (K5)	93	43
MMP(LysArgGly)-PEG5000 (K6)	75	65

Die Ergebnisse der Größenausschlusschromatographie (Abbildung 4.37) und der HPLC (Abbildung 4.38) zeigen, dass im Reaktionsansatz noch freies Peptid enthalten war, welches jedoch abgetrennt wurde. Die Größe der hergestellten Konjugate wurde mittels SDS-PAGE überprüft (Abbildung 4.39). Beide Konjugate liefen bei der Größenbande von 15 kDa, welches dem Laufverhalten des oben beschriebenen Konjugats MMP(Arg)-PEG5000 (K2) entspricht. Das hergestellte Konjugat MMP(Lys)-PEG5000 (K5) hatte eine molare Masse von ca. 7900 g/mol und das Konjugat MMP(LysArgGly)-PEG5000 (K6) von 8500 g/mol. Die molaren Massen liegen somit im gleichen Größenbereich wie das Konjugat MMP(Arg)-PEG5000 (K2) ($M \approx 8200$ g/mol). In den Polyacrylamidgelen sieht man außerdem, dass im Falle des Peptids P6 als Folge der Dimerisierung über die Cysteinseitenketten zwei Banden auftraten (Abbildung 4.39b, Spur 2 und 3). Im Falle des Peptids P5 ist hingegen nur beim frisch gelösten Peptid eine dünne Bande bei ca. 10 kDa zu sehen (Abbildung 4.39b, Spur 3). Längere Inkubationszeiten des Peptids P5 führten häufig dazu, dass das Peptid nicht mehr wanderte und in der Tasche verblieb (Abbildung 4.39b, Spur 2). Teilweise konnte bei längerer Aufbewahrung beobachtet werden, dass die Peptidlösung trübe wurde, was auf eine Ausfällung des Peptids, möglicherweise infolge der Dimerisierung, hindeutet.

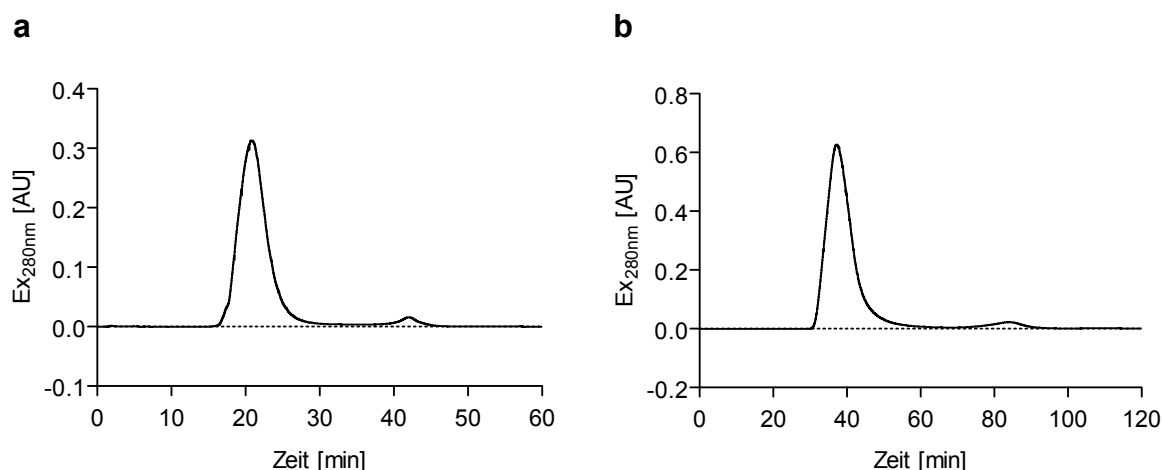


Abbildung 4.37: Größenausschlusschromatogramm der Reinigung von MMP(Lys)-PEG5000 (K5) und MMP(LysArgGly)-PEG5000 (K6).

(a) $t_{Ret}(K5) = 15-30$ min; $t_{Ret}(P5) = 40-45$ min

(b) $t_{Ret}(K6) = 30-50$ min; $t_{Ret}(P6) = 80-90$ min

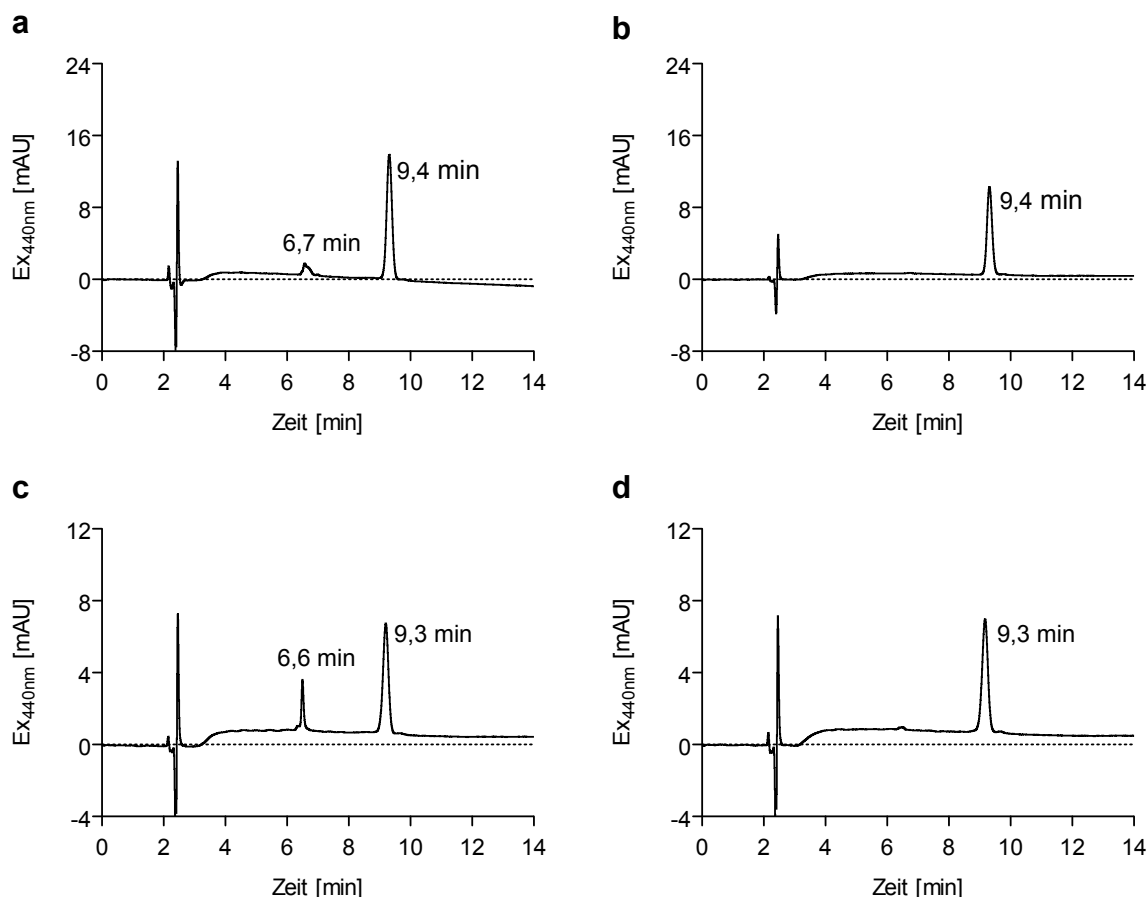


Abbildung 4.38: HPLC-Chromatogramme des Reaktionsansatzes (a, c) und des gereinigten MMP(Lys)-PEG5000 (K5) (b) bzw. MMP(LysArgGly)-PEG5000 (K6) (d).

(a), (b) $t_{\text{Ret}}(\text{P5}) = 6,7 \text{ min}$; $t_{\text{Ret}}(\text{K5}) = 9,4 \text{ min}$

(c), (d) $t_{\text{Ret}}(\text{P6}) = 6,6 \text{ min}$ $t_{\text{Ret}}(\text{K6}) = 9,3 \text{ min}$.

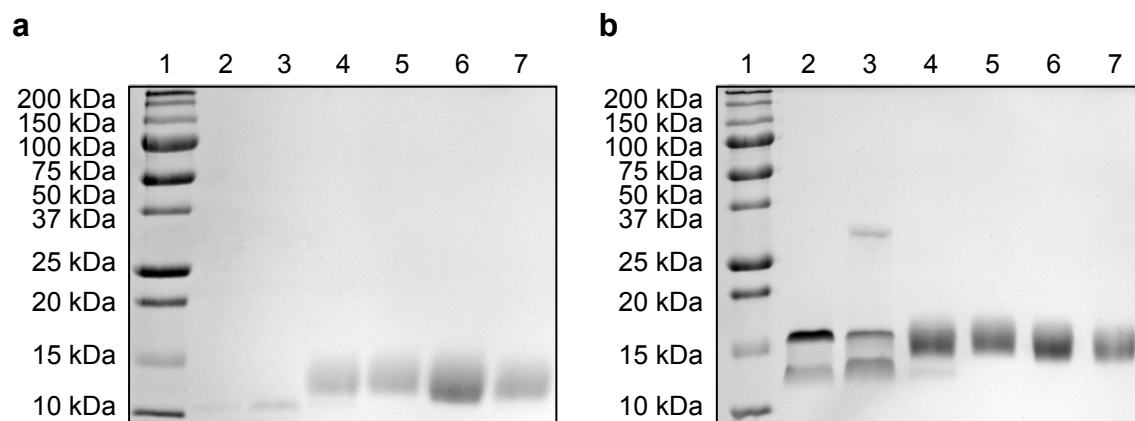


Abbildung 4.39: SDS-PAGE von MMP(Lys)-PEG5000 (K5) (a) und MMP(LysArgGly)-PEG5000 (K6) (b). (1) Proteingrößenmarker (2) P5 (a) bzw. P6 (b) (3) P5 (a) bzw. P6 (b) (frisch gelöst) (4) K5 (a) bzw. K6 (b) (ungereinigt) (5-7) K5 (a) bzw. K6 (b), gesammelte Fraktionen nach Größenausschuschromatographie.

Das Peptid P5 lief knapp über der Größenbande von 10 kDa und MMP(Lys)-PEG5000 (K5) lief unter 15 kDa. Längere Inkubationszeiten führten dazu, dass das Peptid P5 nicht mehr durch das Gel wanderte (a, Spur 2). Das Peptid P6 wanderte zwischen 10 kDa und 15 kDa, das daraus gebildete Dimer knapp über 15 kDa. MMP(LysArgGly)-PEG5000 (K6) lief knapp über 15 kDa.

4.2.2. Synthese und Charakterisierung der PSOP

Die Anlagerung der Fluorescein-markierten Konjugate an die VSOP bewirkte, dass die Fluoreszenz der Farbstoffe gelöscht wurde. Die Fluoreszenzlöschung beruht dabei auf der Absorption des emittierten Lichts durch die Eisenpartikel [175, 176] und durch die räumliche Nähe der Farbstoffe untereinander [72, 73, 177]. Außerdem veränderte sich durch die Anlagerung der Konjugate der hydrodynamische Durchmesser der Partikel. Lagern sich die Peptid-PEG-Konjugate über die positiv geladene Kopplungsdomäne an die negativ geladene Citrathülle an, erhöht sich der hydrodynamische Durchmesser und die Partikel sind durch die PEG-Hülle sterisch stabilisiert. Beide Effekte (Fluoreszenzlöschung und Größenzunahme) wurden genutzt, um näherungsweise zu bestimmen, wie viel Konjugat auf der Partikeloberfläche binden kann (Kapitel 4.2.2.1. Untersuchung des optimalen Verhältnisses aus Konjugat zu VSOP), sowie zur Charakterisierung der PSOP (Kapitel 4.2.2.2. / 4.2.2.3. Untersuchung der Stabilität und enzymatischen Aktivierbarkeit). In Tabelle 4.8 sind die Achsenbeschriftungen der folgenden Abbildungen der Fluoreszenzmessungen erläutert. Die Größmessungen erfolgten mittels dynamischer Lichtstreuung. Den Berechnungen der Verhältnisse aus Konjugat zu VSOP lag die Annahme von 6500 Eisenatomen pro VSOP zugrunde (siehe Kapitel 6.2. VSOP; Kapitel 4.1.2.1. Kovalente Bindung von AnxA5 an VSOP-Oberfläche).

Tabelle 4.8: Erläuterungen zu den durchgeführten Fluoreszenzmessungen. Alle Messungen wurden bei gleicher Anregungs- bzw. Emissionswellenlänge ($\text{Ex} = 494 \text{ nm}$, $\text{Em} = 521 \text{ nm}$) durchgeführt.

Achsenbeschriftung	Erläuterung
Fluoreszenzintensität [AU]	gemessene Fluoreszenz der PSOP-Suspension bzw. Konjugatlösung
Fluoreszenzintensität [%]	gemessene Fluoreszenz der PSOP-Suspension in Bezug auf die mögliche Fluoreszenz (als 100 % Fluoreszenz wurde der Fluoreszenzwert der reinen Konjugatlösung bei gleicher Konzentration angenommen)
relative Fluoreszenz der PSOP	Fluoreszenzintensität der PSOP-Suspension geteilt durch die Fluoreszenzintensität der reinen Konjugatlösung (gleiche Konjugatkonzentration)

4.2.2.1. Untersuchung des optimalen Verhältnisses aus Konjugat zu VSOP

Zur Bestimmung des optimalen Verhältnisses aus Konjugat zu VSOP, wurden die VSOP zu verschiedenen konzentrierten Konjugatlösungen gegeben und die Größe der gebildeten PSOP sowie die Fluoreszenz gemessen. Als Vergleichswert wurde die Fluoreszenz der Konjugate alleine (in den gleichen Konzentrationen) gemessen. Als ein bevorzugtes Verhältnis wurden solche Verhältnisse gewählt, bei denen die Fluoreszenz vollständig oder nahezu vollständig gelöscht wurde und sich die Partikeldurchmesser nicht mehr änderten. Bei diesen Verhältnissen wurde angenommen, dass sich der Farbstoff noch nah am Metallkern befindet und somit die Konjugatmenge auf die Oberfläche passt. Dies sollte gewährleisten, dass das Konjugat über einen großen Teil des polykationischen Peptids an die negative Oberfläche bindet und somit die Stabilität der PSOP bzw. der Konjugatbindung erhöht. Ein konstanter Partikeldurchmesser sollte ferner die Annahme erlauben, dass die Partikeloberfläche vollständig bedeckt ist, und Auskunft über die minimal nötige Konjugatmenge für eine vollständige Bedeckung geben. In den folgenden Abbildungen sind links jeweils die Ergebnisse der Fluoreszenzmessung der Konjugate sowie der Konjugate in Gegenwart von VSOP (PSOP) gezeigt. Rechts sind die Größenmessungen der PSOP (linke y-Achse) sowie die relativen Fluoreszenzmessungen (Fluoreszenz der PSOP geteilt durch Fluoreszenz der entsprechenden Konjugatmenge ohne VSOP, rechte y-Achse) in Abhängigkeit von der Konjugatmenge pro VSOP zusammengefasst.

Abbildung 4.40 zeigt die Ergebnisse für verschiedene Verhältnisse der argininreichen Konjugate (MMP(Arg)-PEG5000, K2; MMP(Arg)-(PEG5000)₂, K3; MMP(Arg)-(PEG5000)₂-Cys-Dimer, K4) zu den VSOP. Während die Fluoreszenz der Konjugatlösung mit der Konzentration linear anstieg, war im Falle der PSOP erst ab einer gewissen Konjugatmenge pro VSOP ein Anstieg der Fluoreszenz zu messen (Abbildung 4.40a, c, e). Noch deutlicher wurde dies bei den relativen Fluoreszenzwerten (Abbildung 4.40b, d, f). Bei ca. 15 MMP(Arg)-PEG5000 (K2) bzw. MMP(Arg)-(PEG5000)₂ (K3) pro VSOP war die Fluoreszenz vollständig gelöscht. Die parallel dazu durchgeführten Größenmessungen der PSOP zeigten, dass bei einem niedrigen Verhältnis von Konjugat zu VSOP die Größen sehr unterschiedlich waren (Abbildung 4.40b, d, f). Die Größe der PSOP blieb jedoch ab 15 MMP(Arg)-PEG5000 (K2) (37 nm) bzw. 10 MMP(Arg)-(PEG5000)₂ (K3) (28 nm) in etwa gleich. Für die bessere Vergleichbarkeit hinsichtlich der Stabilität und der enzymatischen Aktivierbarkeit wurden die Konjugate K2 und K3 in den fortführenden Arbeiten beide in einem Verhältnis von 15 Konjugaten pro VSOP zur elektrostatischen Beschichtung eingesetzt. Beim Konjugat MMP(Arg)-(PEG5000)₂-Cys-Dimer (K4) war ein Anstieg der Fluoreszenz ab 10 Konjugaten pro VSOP zu beobachten (Abbildung 4.40e, f). Die Größe war ab 3 Konjugaten pro VSOP etwa gleichbleibend und die PSOP hatten mit 3 MMP(Arg)-(PEG5000)₂-Cys-Dimeren (K4) einen hydrodynamischen Durchmesser von ca. 26 nm (Abbildung 4.40f).

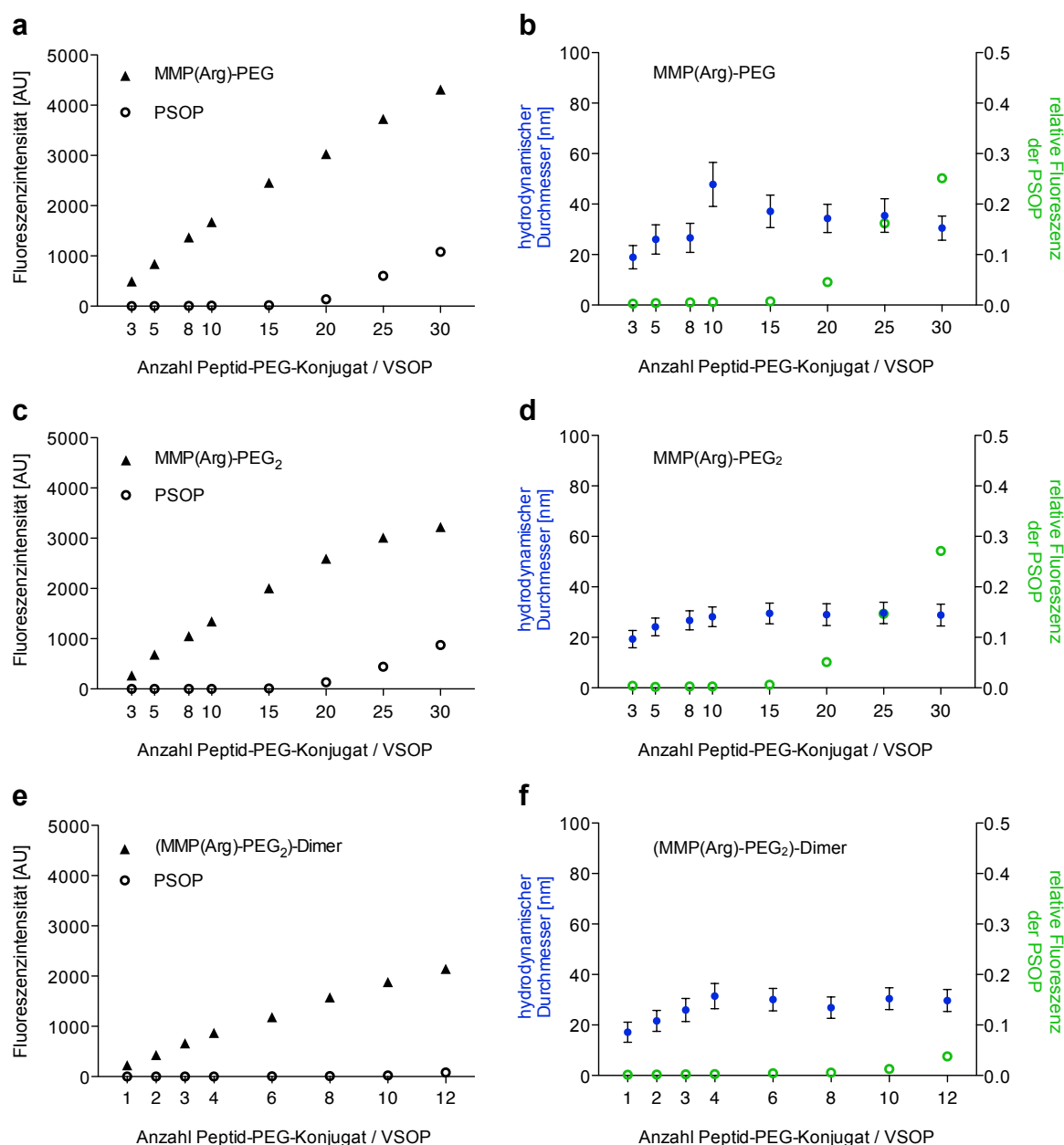


Abbildung 4.40: Bestimmung des optimalen Verhältnisses aus argininreichen Konjugaten zu VSOP durch Fluoreszenz- und Größenmessung. Bei 15 MMP(Arg)-PEG5000 (K2) und 15 MMP(Arg)-(PEG5000)₂ (K3) pro VSOP war die Fluoreszenz noch vollständig gelöscht (**a**, **c**) und der hydrodynamische Durchmesser der PSOP veränderte sich nur noch geringfügig (**b**, **d**). Beim (MMP(Arg)-(PEG5000)₂)-Cys-Dimer (K4) war die Fluoreszenz mit 8 Konjugaten pro VSOP noch vollständig gelöscht (**e**) und der hydrodynamische Durchmesser veränderte sich ab 3 (MMP(Arg)-(PEG5000)₂)-Cys-Dimeren (K4) pro VSOP nur noch geringfügig (**f**).

Erläuterungen der Achsenbeschriftungen und Messbedingungen siehe Tabelle 4.8.

Die Peptide P5 und P6 zur Herstellung der Konjugate MMP(Lys)-PEG5000 (K5) und MMP(LysArgGly)-PEG5000 (K6) ähnelten dem Peptid P2 zur Herstellung des Konjugats MMP(Arg)-PEG5000 (K2). Durch die Polylysinkette konnten die Konjugate ebenfalls elektrostatisch an die VSOP-Oberfläche binden. In beiden Fällen stieg die Fluoreszenz der

PSOP-Suspension ab ca. 25 Konjugaten an (Abbildung 4.41). Im Falle des MMP(Lys)-PEG5000 (K5) änderte sich der hydrodynamische Durchmesser der PSOP ab ca. 15 Konjugaten pro VSOP nur noch wenig und lag bei 38 nm und mit 20 Konjugaten bei 35 nm (Abbildung 4.41b). Bei MMP(LysArgGly)-PEG5000 (K6) änderte sich die Größe ab ca. 20 Konjugaten pro VSOP nicht mehr und die PSOP hatten in diesem Fall einen hydrodynamischen Durchmesser von 52 nm (Abbildung 4.41d). Um auch die lysinreichen Konjugate besser miteinander vergleichen zu können, wurde hier für beide Konstrukte als bevorzugtes Verhältnis 20 Konjugate pro VSOP gewählt.

Die gewählten Verhältnisse aus Konjugat zu VSOP zur Herstellung von PSOP sind für die verschiedenen Konjugate mit den dazugehörigen Durchmessern der PSOP in Tabelle 4.9 zusammengefasst. Ausgehend von den aufgeführten Verhältnissen wurden in ausgewählten Fällen noch weitere Verhältnisse untersucht.

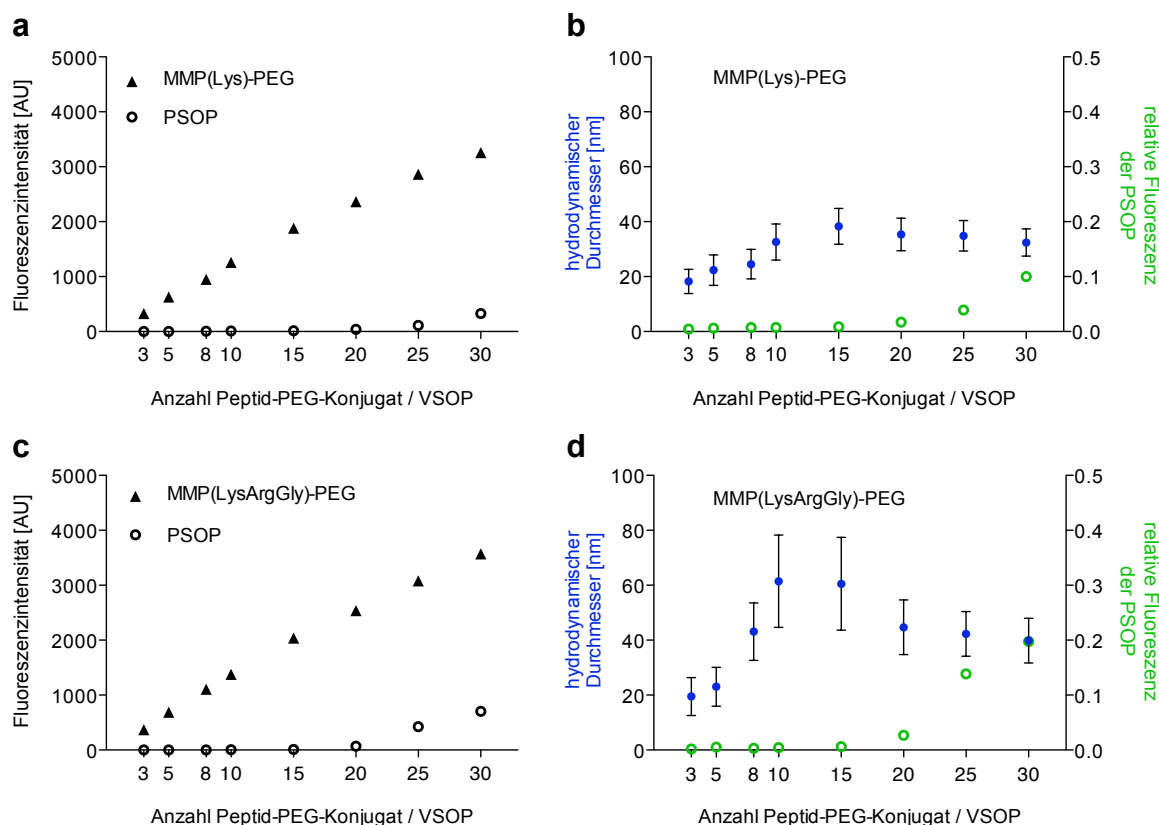


Abbildung 4.41: Bestimmung des optimalen Verhältnisses aus lysinreichen Konjugaten zu VSOP durch Fluoreszenz- und Größenmessung. Bei MMP(Lys)-PEG5000 (K5) war mit 15 Konjugaten pro VSOP die Fluoreszenz noch vollständig gelöscht und der hydrodynamische Durchmesser blieb nahezu gleich (**a**, **b**). Bei MMP(LysArgGly)-PEG5000 (K6) war die Fluoreszenz mit 15 Konjugaten pro VSOP ebenfalls noch nahezu vollständig gelöscht und der hydrodynamische Durchmesser veränderte sich ab 20 Konjugaten pro VSOP nur noch leicht (**c**, **d**).

Erläuterungen der Achsenbeschriftungen und Messbedingungen siehe Tabelle 4.8.

Tabelle 4.9: Eingesetzte Konjugate und die jeweils gewählten Verhältnisse aus Konjugat zu VSOP mit den dazugehörigen hydrodynamischen Durchmessern der elektrostatisch beschichteten PSOP.

Konjugat	bevorzugtes Verhältnis	hydrodynamischer Durchmesser [nm]
MMP(Arg)-PEG5000 (K2)	15	37
MMP(Arg)-(PEG5000) ₂ (K3)	15	29
MMP(Arg)-(PEG5000) ₂ -Cys-Dimer (K4)	3	26
MMP(Lys)-PEG5000 (K5)	20	35
MMP(LysArgGly)-PEG5000 (K6)	20	52

4.2.2.2. Untersuchung der Stabilität und enzymatischen Aktivierbarkeit elektrostatisch beschichteter PSOP mit argininreichen Konjugaten

Die elektrostatisch hergestellten PSOP wurden zur Untersuchung der Stabilität hinsichtlich ihres Verhaltens in NaCl-haltigen Lösungen analysiert. In Abbildung 4.42 sind die Größen- und Fluoreszenzmessungen der PSOP in Lösungen mit ansteigendem NaCl-Gehalt zusammengefasst. Anhand der Zugabe von NaCl sollte ein mögliches Dissoziationsverhalten der Konjugate analysiert werden, um so ein Indiz für die Stabilität der Partikel bzw. der Beschichtung *in vivo* zu erhalten.

Bei den Konjugaten MMP(Arg)-PEG5000 (K2) und MMP(Arg)-(PEG5000)₂ (K3) bewirkte die Zugabe von NaCl einen deutlichen Anstieg der Fluoreszenz bei gleichzeitiger Abnahme des hydrodynamischen Durchmessers (Abbildung 4.42a, b). Während in der NaCl-freien Lösung die Fluoreszenz der Konjugate nahezu vollständig gelöscht war, waren bei der höchsten NaCl-Konzentration etwa 40 % der möglichen Fluoreszenz wieder messbar. Die mit MMP(Arg)-PEG5000 (K2) beschichteten PSOP hatten vor der Zugabe von NaCl in Wasser einen hydrodynamischen Durchmesser von 37 nm. Dieser verringerte sich durch die NaCl-Zugabe auf ca. 17 nm. Bei den mit MMP(Arg)-(PEG5000)₂ (K3) beschichteten PSOP verringerte sich der hydrodynamische Durchmesser von 29 nm in Wasser auf 13 nm in 600 mM NaCl-Lösung.

Die PSOP, welche mit dem MMP(Arg)-(PEG5000)₂-Cys-Dimer (K4) beschichtet wurden, reagierten weniger stark auf die NaCl-Zugabe (Abbildung 4.42c). Während auch hier in Wasser die Fluoreszenz vollständig gelöscht war, stieg diese durch die NaCl-Zugabe lediglich auf ca. 15 % der möglichen Fluoreszenz an. Außerdem änderte sich auch der hydrodynamische

Durchmesser durch die anfängliche Zugabe von NaCl nur leicht (100 mM NaCl: 26 nm; 300 mM NaCl: 23 nm). Erst bei einer NaCl-Konzentration von 600 mM stieg der hydrodynamische Durchmesser stark an und lag mit 52 nm über dem Durchmesser von 25 nm in Wasser.

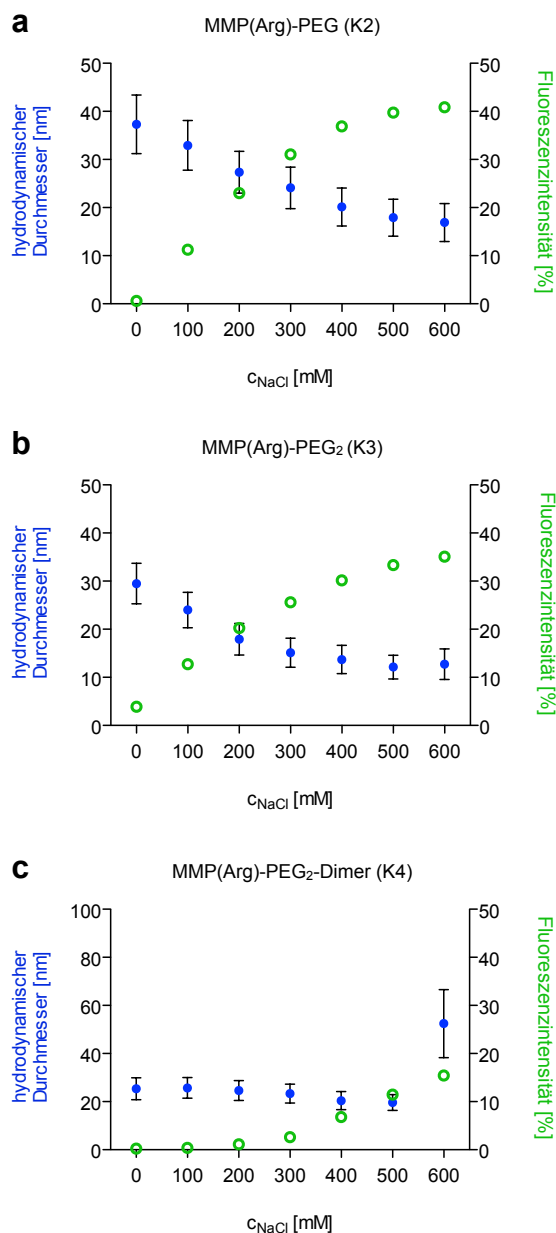


Abbildung 4.42: Verhalten der elektrostatisch beschichteten PSOP mit MMP(Arg)-PEG5000 (K2) (a), MMP(Arg)-(PEG5000)₂ (K3) (b) und MMP(Arg)-(PEG5000)₂-Cys-Dimer (K4) (c) in Lösungen mit ansteigendem NaCl-Gehalt. Die NaCl-Zugabe bewirkte im Falle der mit K2 und K3 beschichteten PSOP eine Abnahme des hydrodynamischen Durchmessers (K2: 37 nm → 17 nm; K3: 29 nm → 13 nm) und eine Zunahme der messbaren Fluoreszenz (K2: 40 %; K3: 35 %). Bei den mit K4 beschichteten PSOP änderte sich der Durchmesser anfänglich nur wenig und die messbare Fluoreszenz stieg nur auf ca. 15 %.

Erläuterungen der Achsenbeschriftungen und Messbedingungen siehe Tabelle 4.8.

Die enzymatische Aktivierbarkeit wurde untersucht, indem die hergestellten PSOP zunächst im Enzympuffer (10 mM HEPES-Puffer, 140 mM NaCl, 1,3 mM CaCl_2 und 50 μM ZnCl_2 , pH 7,4) suspendiert wurden. Dieser enthielt für die MMP-9 nötige Zinkionen. Nach Inkubation der PSOP über zwei Stunden im Enzympuffer wurde das Enzym MMP-9 zugegeben und erneut über zwei Stunden inkubiert. Während beider Inkubationsschritte wurden die Größe sowie die Fluoreszenz gemessen. Durch die MMP-9 sollten die Peptid-PEG-Ketten gespalten werden, so dass das Partikel seine sterische Stabilisierung verliert und eine gemischt geladene Partikeloberfläche freigelegt wird. Dies wiederum soll die Aggregation der Partikel bewirken, was sich in der dynamischen Lichtstreuung durch einen ansteigenden Durchmesser verfolgen lässt. Da sich in dem Fall der hier eingesetzten Konjugate der Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein ausgehend von der polykationischen Kopplungsdomäne vor der Schnittstelle befindet und mit dem Peptid-Rest auf der Partikeloberfläche verbleibt, müsste die Fluoreszenz abnehmen, da die sedimentierenden Partikel aus dem Detektionsfenster verschwinden bzw. sich die Fluoreszenzlöschung durch die Aggregation erhöht. In Abbildung 4.43 sind die Größen- und Fluoreszenzmessungen der PSOP mit den Konjugaten MMP(Arg)-PEG5000 (K2) und MMP(Arg)-(PEG5000)₂ (K3) zusammengefasst. Der hydrodynamische Durchmesser der Partikel blieb während der ersten zwei Stunden nahezu konstant (37-47 nm). Direkt nach der Enzymzugabe stieg dieser jedoch an. Im Falle der mit MMP(Arg)-PEG5000 (K2) beschichteten PSOP setzte die Aggregation 20 min nach Enzymzugabe ein. Bei den mit MMP(Arg)-(PEG5000)₂ (K3) beschichteten PSOP verhielt es sich bis auf eine Verzögerung ähnlich. Vor der Enzymzugabe schwankte der hydrodynamische Durchmesser lediglich etwas und betrug ca. 25 nm. Die Aggregation setzte 40 min nach Enzymzugabe ein. In beiden Fällen wurden am Ende der Inkubationszeit hydrodynamische Durchmesser von 3000-4000 nm gemessen. Darüber hinaus war zu beobachten, dass die Partikel auf den Boden der Küvette herabgesunken waren. Ähnlich wie in den NaCl-haltigen Lösungen konnte bei den PSOP in Enzympuffer ein hoher Fluoreszenzanteil gemessen werden. Mit einem messbaren Anteil von ca. 40 % wurden somit nur noch 60 % der Fluoreszenz vollständig gelöscht. Nach der Enzymzugabe sank die messbare Fluoreszenz auf 30 % ab.

Das Verhalten der mit dem Dimer (K4) beschichteten PSOP unterschied sich deutlich von den oben beschriebenen PSOP und die Aktivierung durch die Enzymzugabe konnte nicht erreicht werden. Der hydrodynamische Durchmesser sowie die Fluoreszenz änderten sich über die Messzeit nicht (Abbildung 4.44). Der hydrodynamische Durchmesser lag sowohl vor als auch nach der Enzymzugabe knapp unter 30 nm und die Fluoreszenz schwankte lediglich um 2-3 % der möglichen messbaren Fluoreszenz. Neben 3 Dimeren pro VSOP wurden weitere Verhältnisse getestet, welche in Abbildung 4.45 zusammengefasst sind. So wurden zusätzlich PSOP mit 2, 6 und 9 MMP(Arg)-(PEG5000)₂-Cys-Dimeren (K4) pro VSOP hergestellt und die Größen gemessen. Auch hier blieb die Aggregation aus und die Partikel konnten nicht enzymatisch aktiviert werden.

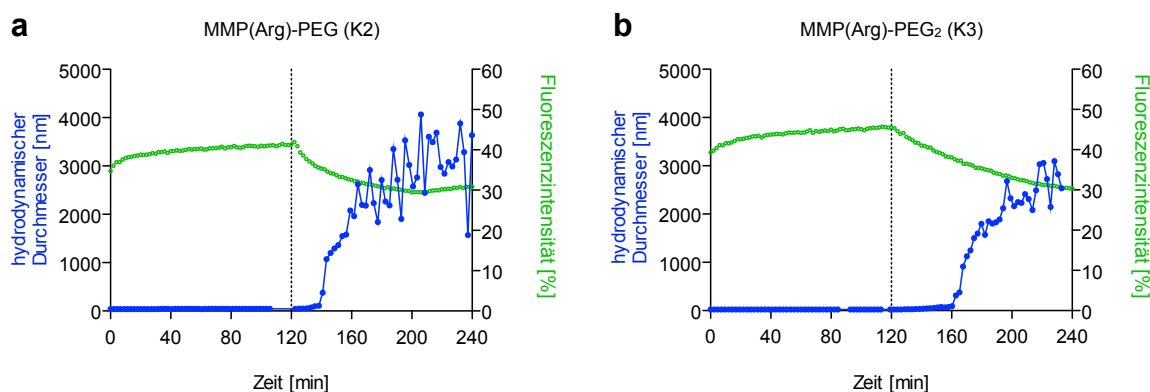


Abbildung 4.43: Enzymatische Aktivierung der elektrostatisch beschichteten PSOP mit 15 MMP(Arg)-PEG5000 (K2) (a) und 15 MMP(Arg)-(PEG5000)₂ (K3) (b). Der hydrodynamische Durchmesser der Partikel blieb bis zur Zugabe des Enzyms nahezu konstant. Nach der MMP-9-Zugabe (vertikale Punktlinie) stieg dieser in beiden Fällen stark an und die Partikel aggregierten. Die Fluoreszenz stieg bis zur Enzymzugabe auf über 40 % an und nahm dann auf ca. 30 % ab.

Erläuterungen der Achsenbeschriftungen und Messbedingungen siehe Tabelle 4.8.

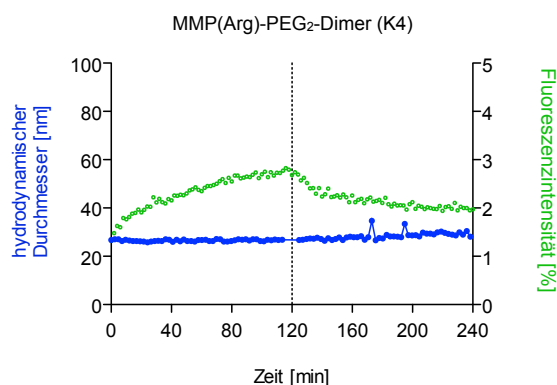


Abbildung 4.44: Enzymatische Aktivierung der elektrostatisch beschichteten PSOP mit 3 MMP(Arg)-(PEG5000)₂-Cys-Dimeren (K4). Der hydrodynamische Durchmesser der Partikel von 27 nm blieb bis zur Zugabe des Enzyms nahezu konstant und änderte sich auch nach der MMP-9-Zugabe (vertikale Punktlinie) nicht. Die Fluoreszenz schwankte über die gesamte Messdauer lediglich um 2-3 % der messbaren Fluoreszenz. Die Partikelaggregation setzte nicht ein.

Erläuterungen der Achsenbeschriftungen und Messbedingungen siehe Tabelle 4.8.

Zusätzlich zu den hier aufgeführten Ergebnissen konnte beobachtet werden, dass die PSOP, welche mit den Monomeren MMP(Arg)-PEG5000 (K2) und MMP(Arg)-(PEG5000)₂ (K3) elektrostatisch beschichtet wurden, auch ohne Enzymzugabe zur Aggregation neigten. Sowohl in Wasser als auch in Enzympuffer inkubierte Proben wiesen nach einigen Wochen einen Bodensatz aus aggregierten und sedimentierten Partikeln auf. Im Falle der PSOP, welche hingegen mit MMP(Arg)-(PEG5000)₂-Cys-Dimeren (K4) beschichtet wurden, wiesen die Partikel auch nach Inkubation über mehrere Tage in Anwesenheit des Enzyms keine Aggregate auf.

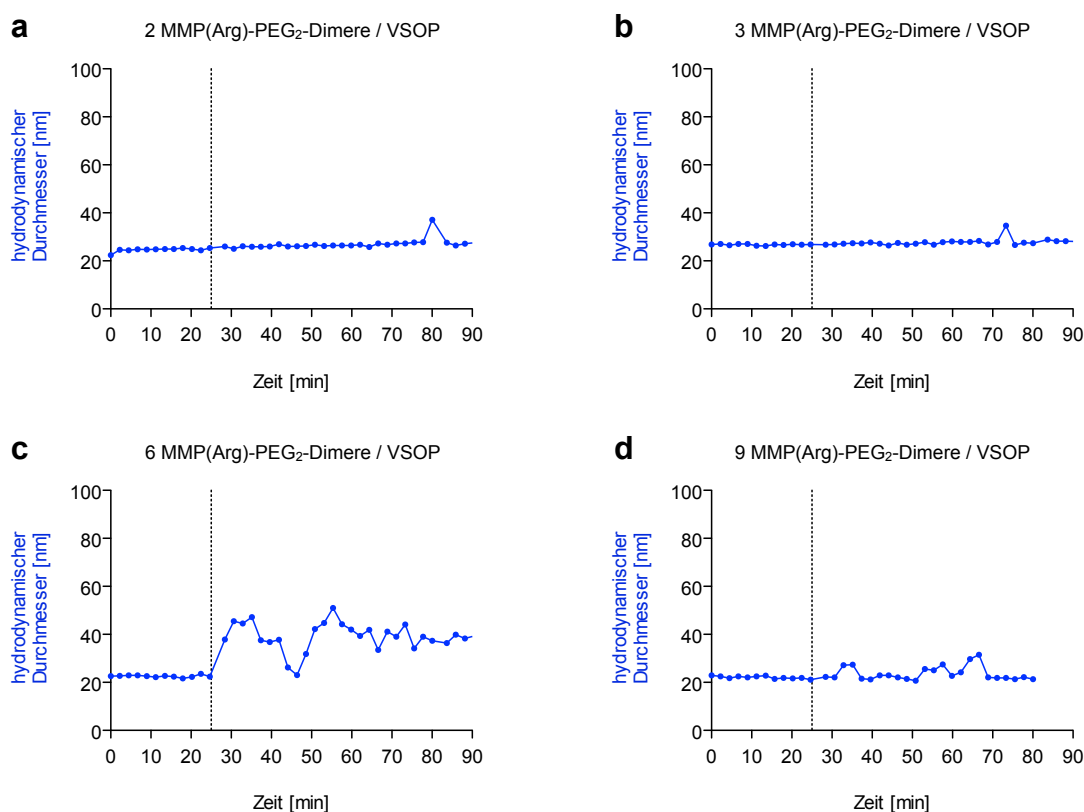


Abbildung 4.45: Enzymatische Aktivierung der elektrostatisch beschichteten PSOP mit 2, 3, 6 oder 9 MMP(Arg)-(PEG5000)₂-Cys-Dimeren (K4) pro VSOP. In allen vier Fällen blieb die gewünschte Partikelaggregation durch die Enzymzugabe (vertikale Punktlinie) aus. Der hydrodynamische Durchmesser der Partikel lag vor der Zugabe jeweils bei 20-30 nm. Lediglich bei 6 Dimeren pro VSOP war nach der Enzymzugabe eine verstärkte Schwankung bei der Größenmessung zu beobachten. Der hydrodynamische Durchmesser stieg jedoch auch hier nicht über ca. 50 nm an.

4.2.2.3. Untersuchung der Stabilität und enzymatischen Aktivierbarkeit kovalent beschichteter PSOP mit lysinreichen Konjugaten

Die kovalente Anbindung der Peptid-PEG-Konjugate an die Citrathülle der VSOP erfolgte nach Aktivierung der Carboxygruppen mit EDC und Sulfo-NHS entsprechend Abbildung 4.46. Die Umsetzung erfolgte innerhalb von 15 min in einem MES-Puffer (pH 6,0). Im Falle einer Reinigung der aktivierten VSOP folgte auf den ersten Schritt, die Abtrennung von überschüssigem EDC und Sulfo-NHS über Zentrifugenfilter. Im zweiten Schritt wurden die aktivierten VSOP zu der jeweiligen Konjugatlösung gegeben. Die Umsetzung erfolgte über 18 Stunden in einem 100 mM HEPES-Puffer (pH 7,4). Eine Reinigung der PSOP wurde ebenfalls über den Einsatz von Zentrifugenfiltern erreicht. Es wurden drei verschiedene Ansätze für die Synthese kovalent beschichteter PSOP untersucht:

- (1) Keine Reinigungsschritte.
- (2) Reinigung der aktivierten VSOP.
- (3) Reinigung der aktivierten VSOP sowie der kovalent beschichteten PSOP.

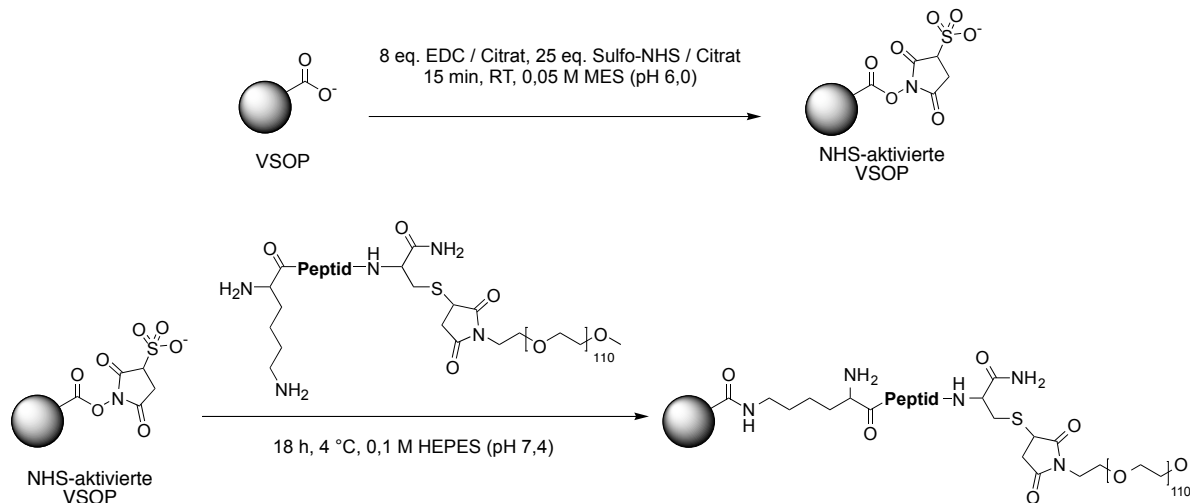


Abbildung 4.46: Vereinfachte Darstellung der kovalenten Anbindung lysinreicher Peptid-PEG-Konjugate an die Citrathülle der VSOP. Die kovalente Anbindung der Konjugate findet über mehrere primäre Aminogruppen sowie aktivierter Citratgruppen statt. Die Abbildung stellt exemplarisch nur die Reaktion einer einzelnen Aminogruppe mit einem Succinimidylester dar.

Die verschiedenen Ansätze wurden ebenfalls hinsichtlich des Dissoziationsverhaltens der Konjugate MMP(Lys)-PEG5000 (K5) und MMP(LysArgGly)-PEG5000 (K6) in NaCl-haltigen Lösungen sowie der enzymatischen Aktivierbarkeit miteinander verglichen. Die Durchführung der Messungen erfolgte analog zu den in Kapitel 4.2.2.2. (Elektrostatisch beschichtete PSOP mit argininreichen Konjugaten) beschriebenen Messungen. Sofern nicht anders angegeben, wurden die VSOP stets mit 20 Peptid-PEG-Konjugaten kovalent beschichtet. Die hier eingesetzten Peptide verfügten auch über den Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein. Dieser befand sich jedoch ausgehend von der polykationischen Kopplungsdomäne hinter der Schnittstelle für die MMP-9 und sollte mit der PEG-Kette abgespalten werden. Im Experiment sollte sich dies bei erfolgreicher enzymatischer Aktivierung durch einen Anstieg der messbaren Fluoreszenz äußern.

Als weiterer Vergleich wurden die VSOP mit den hier verwendeten Peptid-PEG-Konjugaten auch elektrostatisch beschichtet und ebenfalls hinsichtlich des Dissoziationsverhaltens in NaCl-haltigen Lösungen und der enzymatischen Aktivierbarkeit untersucht. Die dazugehörigen Messungen sind in Abbildung 4.47 dargestellt. In beiden Fällen bewirkte die NaCl-Zugabe eine Abnahme des hydrodynamischen Durchmessers und eine Zunahme der Fluoreszenz. Die Aggregation der Partikel setzte in beiden Fällen schon kurz nach Zugabe des Enzyms MMP-9 ein. Auch die Fluoreszenz stieg mit der Zugabe des Enzyms stetig an. Im Falle

der PSOP, welche elektrostatisch mit MMP(Lys)-PEG5000 (K5) beschichtet wurden, wurden über 55 % der messbaren Fluoreszenz nachgewiesen. Die Suspension der mit MMP(LysArgGly)-PEG5000 (K6) elektrostatisch beschichteten PSOP wies eine Fluoreszenz von 65 % auf.

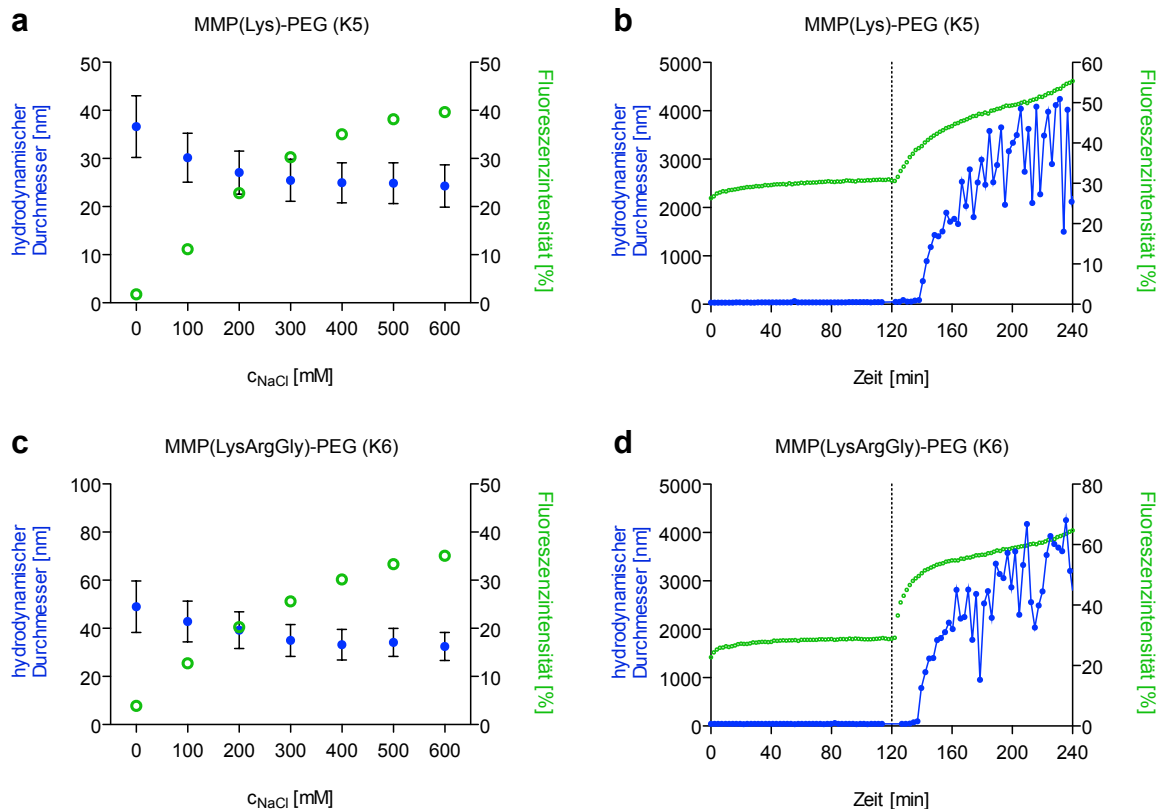


Abbildung 4.47: Untersuchung elektrostatisch beschichteter PSOP mit 20 MMP(Lys)-PEG5000 (K5) (a, b) bzw. 20 MMP(LysArgGly)-PEG5000 (K6) (c, d): Verhalten der PSOP in Lösungen mit ansteigendem NaCl-Gehalt (links) und enzymatische Aktivierung der PSOP (rechts). Die NaCl-Zugabe bewirkte eine Abnahme des hydrodynamischen Durchmessers (K5: 37 nm → 24 nm; K6: 49 nm → 33 nm) und eine Zunahme der messbaren Fluoreszenz (K5: 40 %; K6: 35 %). Die Inkubation der PSOP in Enzympuffer hatte zur Folge, dass die Fluoreszenz nicht mehr vollständig gelöscht war. Durch die Enzymzugabe stieg die Fluoreszenz weiter an (K5: 30 % → knapp 60 %; K6: 30 % → über 60 %). Der hydrodynamische Durchmesser blieb in beiden Fällen über die Inkubationszeit von 2 Stunden nahezu konstant und erst durch die Enzymzugabe (vertikale Punktlinie) aggregierten die Partikel.

Erläuterungen der Achsenbeschriftungen und Messbedingungen siehe Tabelle 4.8.

(1) Keine Reinigungsschritte

Bei der ersten Variante zur Herstellung kovalent beschichteter PSOP wurde auf jegliche Reinigungsschritte verzichtet. Nach der Aktivierung der VSOP wurden diese direkt mit den jeweiligen Konjugaten zur Reaktion gebracht. Mit beiden lysinreichen Konjugaten (MMP(Lys)-PEG5000; MMP(LysArgGly)-PEG5000) wurden PSOP hergestellt und diese gemessen. Abbildung 4.48 zeigt das Verhalten der mit 20 MMP(Lys)-PEG5000 (K5) bzw. 20 MMP(LysArgGly)-PEG5000 (K6) beschichteten PSOP in Lösungen mit ansteigendem NaCl-Gehalt sowie die Untersuchung der PSOP in Enzympuffer und nach Zugabe des Enzyms.

Im Falle der mit MMP(Lys)-PEG5000 (K5) beschichteten PSOP (Abbildung 4.48a, b) hatte der ansteigende NaCl-Gehalt nahezu keinen Einfluss auf die Größe der Partikel (0 mM NaCl: 27 nm, 600 mM: 25 nm) und die messbare Fluoreszenz stieg von ca. 5 % auf nur ca. 15 % an. Eine Aggregation der Partikel konnte durch die Enzymzugabe nicht erreicht werden. Während die PSOP vor der Enzymzugabe einen hydrodynamischen Durchmesser von ca. 27 nm hatten, erhöhte sich dieser durch die Enzymzugabe vergleichsweise wenig und nach zwei Stunden Inkubationszeit wurden Partikelgrößen von nur ca. 100 nm gemessen. Bei der Fluoreszenz wurde ein leichter Anstieg gemessen. Bei den PSOP im Enzympuffer konnten bereits 20 % der Fluoreszenz gemessen werden und mit der Zugabe des Enzyms stieg der Wert auf ca. 35 % an. Das Verhalten der PSOP, welche kovalent mit MMP(LysArgGly)-PEG5000 (K6) beschichtet wurden, unterschied sich nicht stark von den oben beschriebenen PSOP (Abbildung 4.48c, d). Durch die NaCl-Zugabe änderte sich der hydrodynamische Durchmesser nahezu gar nicht (0 mM NaCl: 42 nm, 600 mM: 41 nm) und auch die Fluoreszenz stieg lediglich von ca. 5 % auf ca. 10 % an. Im Enzympuffer lag die messbare Fluoreszenz bei ebenfalls ca. 10 % und stieg auf knapp unter 20 % an. Die Größe der Partikel änderte sich weder im Enzympuffer noch nach der Enzymzugabe (ca. 40 nm). Die Enzymzugabe bewirkte auch in diesem Fall keine Aggregation und somit keine Aktivierung der Partikel.

(2) Reinigung der aktivierten VSOP

Beim zweiten Synthesansatz wurden die Sulfo-NHS-aktivierten VSOP gereinigt, um überschüssiges EDC und Sulfo-NHS abzutrennen. Für beide lysinreichen Konjugate (K5, K6) wurde die Synthese daher um den Reinigungsschritt über die Zentrifugenfilter erweitert. Um zu gewährleisten, dass die Partikel vor der Zugabe zum Konjugat frei an EDC und Sulfo-NHS waren, wurden die bei der Reinigung gesammelten Fraktionen photometrisch untersucht (Anhang, Abbildung A.7). Die erhaltenen PSOP wurden anschließend ebenfalls hinsichtlich ihres Verhaltens in NaCl-haltigen Lösungen sowie ihrer enzymatischen Aktivierbarkeit getestet (Abbildung 4.49). Ähnlich wie bei den ungereinigten PSOP änderte sich mit an-

steigendem NaCl-Gehalt der hydrodynamischen Durchmesser fast gar nicht. Bei der Fluoreszenz war jedoch wieder ein deutlicher Anstieg mit höherem NaCl-Gehalt zu beobachten, wenn auch deutlich geringer als bei den elektrostatisch beschichteten PSOP. Die enzymatische Aktivierung konnte allerdings auch nach Reinigung der aktivierten VSOP nicht erreicht werden. Durch die Enzymzugabe stieg die Fluoreszenz beider PSOP an. Der hydrodynamische Durchmesser änderte sich lediglich bei den mit MMP(Lys)-PEG5000 (K5) beschichteten PSOP. Dieser Effekt war jedoch ziemlich gering und der Durchmesser stieg lediglich von 27 nm auf knapp unter 100 nm an.

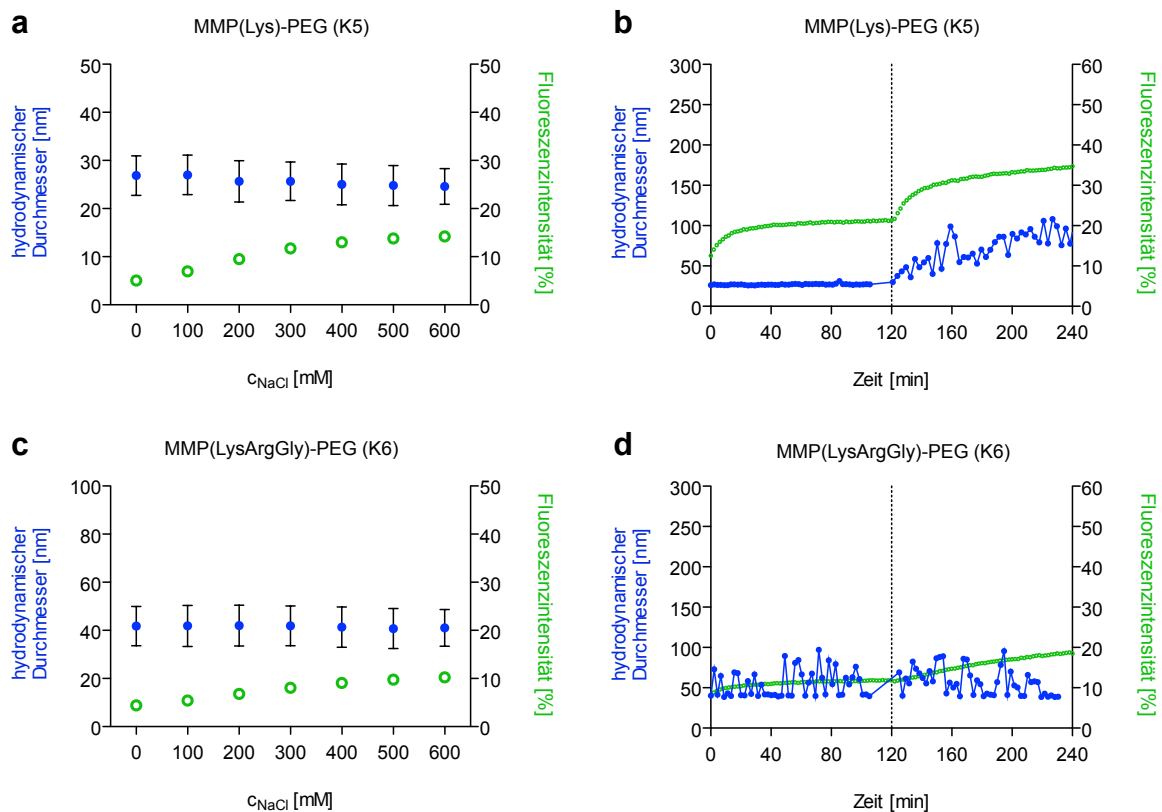


Abbildung 4.48: Untersuchung kovalent beschichteter PSOP mit 20 MMP(Lys)-PEG5000 (K5) (a, b) bzw. 20 MMP(LysArgGly)-PEG5000 (K6) (c, d) ohne Reinigungsschritte: Verhalten der PSOP in Lösungen mit ansteigendem NaCl-Gehalt (links) und enzymatische Aktivierung der PSOP (rechts). Durch die NaCl-Zugabe nahm der hydrodynamische Durchmesser der Partikel minimal ab (K5: 27 nm \rightarrow 25 nm; K6: 42 nm \rightarrow 41 nm). Die messbare Fluoreszenz stieg leicht an (K5: 15 %; K6: 10 %). Im Enzympuffer stieg die Fluoreszenz ebenfalls an (K5: 20 %; K6: 10 %) und erneut nach der Enzymzugabe (K5: 20 \rightarrow 35 %; K6: 10 \rightarrow 20 %). Eine Aggregation der Partikel bewirkte die Enzymzugabe (vertikale Punktlinie) nicht.

Erläuterungen der Achsenbeschriftungen und Messbedingungen siehe Tabelle 4.8.

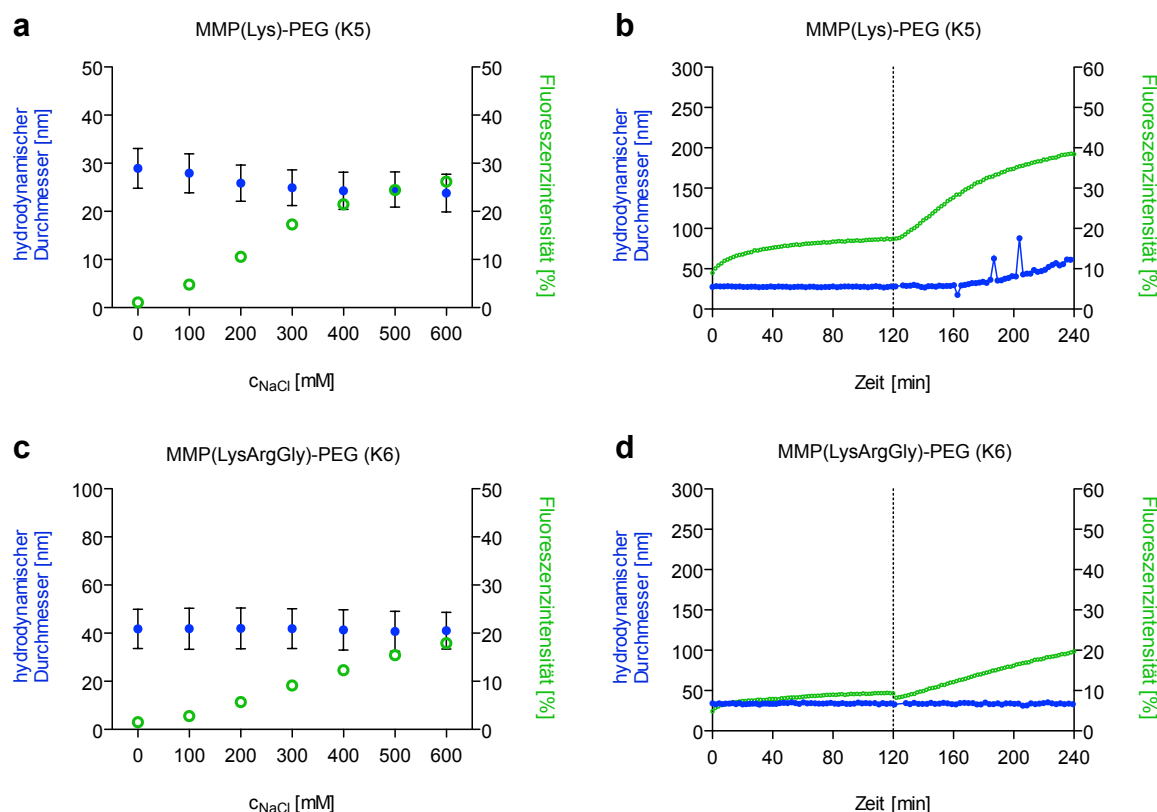


Abbildung 4.49: Untersuchung kovalent beschichteter PSOP mit 20 MMP(Lys)-PEG5000 (K5) (a, b) bzw. 20 MMP(LysArgGly)-PEG5000 (K6) (c, d) mit gereinigter Zwischenstufe (aktivierte VSOP): Verhalten der PSOP in Lösungen mit ansteigendem NaCl-Gehalt (links) und enzymatische Aktivierung der PSOP (rechts). Mit ansteigender NaCl-Konzentration nahm der hydrodynamische Durchmesser der mit K5 (a) beschichteten PSOP ab (0 mM: 29 nm, 600 mM 24 nm), der Durchmesser der mit K6 (c) beschichteten PSOP blieb gleich (41-42 nm). Die Fluoreszenz stieg in beiden Fällen an (K5: 25 %; K6: 20 %). Die Enzymzugabe (vertikale Punktlinie) führte zu einem weiteren Anstieg der Fluoreszenz (K5: 20 → 40 %; K6: 10 → 20 %), aber nicht zur Aggregation der PSOP. Erläuterungen der Achsenbeschriftungen und Messbedingungen siehe Tabelle 4.8.

(3) Reinigung der aktivierten VSOP sowie der kovalent beschichteten PSOP

Beim dritten Synthesansatz kovalent beschichteter PSOP wurden sowohl die aktivierten VSOP als auch die finalen PSOP über Zentrifugenfilter gereinigt (Anhang, Abbildung A.8-A.12). Abbildung 4.50 zeigt die Untersuchung der enzymatischen Aktivierbarkeit der gereinigten PSOP mit 20 MMP(Lys)-PEG5000 (K5) sowie mit 20 MMP(LysArgGly)-PEG5000 (K6). In beiden Fällen wurde durch die Enzymzugabe keine Aggregation der Partikel erzielt. Die Fluoreszenz stieg durch die Enzymzugabe an (MMP(Lys)-PEG5000 (K5): 10 → 35 %; MMP(LysArgGly)-PEG5000 (K6): 10 → 25 %), eine Aggregation der Partikel wurde jedoch nicht erreicht.

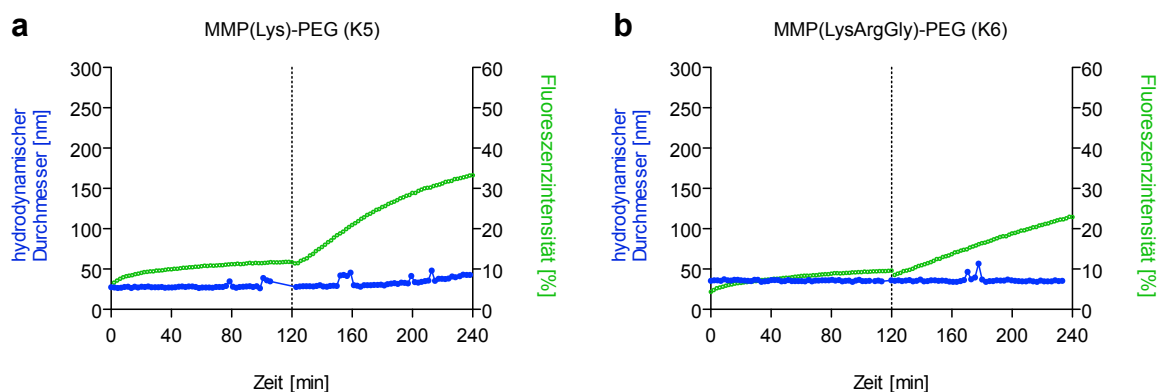


Abbildung 4.50: Untersuchung der enzymatischen Aktivierbarkeit kovalent beschichteter PSOP mit 20 MMP(Lys)-PEG5000 (K5) (a) bzw. 20 MMP(LysArgGly)-PEG5000 (K6) (b) (Reinigung der aktivierten VSOP und der finalen PSOP). Die Enzymzugabe (vertikale Punktlinie) führte zu einem Anstieg der Fluoreszenz (K5: 10 → 35 %; K6: 10 → 25 %), aber nicht zur Aggregation der PSOP. Erläuterungen der Achsenbeschriftungen und Messbedingungen siehe Tabelle 4.8.

Zu den oben beschriebenen drei verschiedenen Ansätzen wurden folgende mögliche Nebenreaktionen bzw. Probleme untersucht:

- (I) Nebenreaktion des Peptids / Fluoresceins mit Sulfo-NHS und EDC
- (II) Enzymhemmung durch freiwerdendes Sulfo-NHS
- (III) Sterische Hinderung des Enzyms durch PEG-Hülle oder durch VSOP

(I) Nebenreaktion des Peptids bzw. des Fluoresceins mit Sulfo-NHS und EDC

Der Einfluss von Sulfo-NHS und EDC auf das Peptid bzw. das gebundene Fluorescein und die Wirkung des Enzyms wurde durch Inkubation des Peptid-PEG-Konjugats MMP(LysArgGly)-PEG5000 (K6) mit Sulfo-NHS und EDC und anschließender Enzymzugabe mittels SDS-PAGE und HPLC untersucht (Abbildung 4.51). Die Sulfo-NHS- und EDC-Lösungen wurden über 15 min inkubiert, bevor diese zu der Konjugatlösung gegeben wurden. Die Untersuchung der Proben mittels SDS-PAGE und HPLC erfolgte am Folgetag, so dass die Bedingungen denen der Synthese von kovalent beschichteten PSOP entsprachen. Zum einen wurden die Konzentrationen so gewählt, dass diese den molaren Verhältnissen in den beschriebenen Synthesen entsprachen. Zum anderen wurden auch die doppelten Konzentrationen an Sulfo-NHS und EDC getestet. Als Vergleich wurde außerdem eine Konjugatprobe mit Enzym versetzt, welche im Vorfeld nicht mit Sulfo-NHS und EDC behandelt wurde. Entsprechend der Messbedingungen bei der dynamischen Lichtstreuung und der Fluoreszenzmessung betrug die Inkubationszeit des Enzyms zwei Stunden, bevor die Untersuchung mittels SDS-PAGE und HPLC erfolgte.

Nach Inkubation des Konjugats alleine mit dem Enzym MMP-9 sah man in der SDS-PAGE zwei Banden (Abbildung 4.51a, Spur 2), welche dem eingesetzten Konjugat (obere Bande) und dem abgespaltenen Peptid-PEG-Rest (mit Fluorescein) (untere Bande) zugeordnet wurden. In den Spuren 3 und 4 wurde das Konjugat nach Inkubation mit Sulfo-NHS und EDC sowie nach der Enzymzugabe aufgetragen. Die Proben unterschieden sich lediglich in der Sulfo-NHS- und EDC-Konzentration. In beiden Fällen sah man jeweils nur eine deutliche Bande, welche ein anderes Laufverhalten als das eingesetzte Konjugat (Spur 1) aufwies. In der HPLC verhielten sich die Sulfo-NHS- und EDC-behandelten Proben nach Enzymzugabe ebenfalls anders als das reine Konjugat (Abbildung 4.51b). In allen drei Fällen sah man zwei Peaks. Der Peak des Konjugats (schwarz, gestrichelte Linie) ist jedoch im Falle der behandelten Proben zu einer höheren Retentionszeit verschoben. Der zweite Peak wurde dem abgespaltenen Peptid-PEG-Rest zugeordnet (da der Farbstoff Fluorescein mit abgespalten wurde, ist der Peptid-PEG-Rest in der HPLC bei einer Wellenlänge von $\lambda = 440$ nm detektierbar). Der Anteil an abgespaltenem Peptid-PEG-Rest war in der unbehandelten Probe am größten und in der Probe mit den hohen Sulfo-NHS- und EDC-Konzentrationen am niedrigsten. Die Ergebnisse belegen somit eine Reaktion von Sulfo-NHS / EDC mit dem Konjugat (verändertes Laufverhalten in der SDS-PAGE, veränderte Retentionszeit in der HPLC) und das veränderte Peptid bzw. Konjugat ist folglich kein Substrat mehr (geringere Ausbeute des Spaltproduktes). Die geringere Ausbeute des Spaltproduktes ist zudem auf eine mögliche Enzymhemmung durch Sulfo-NHS (siehe nächstes Kapitel) zurückzuführen.

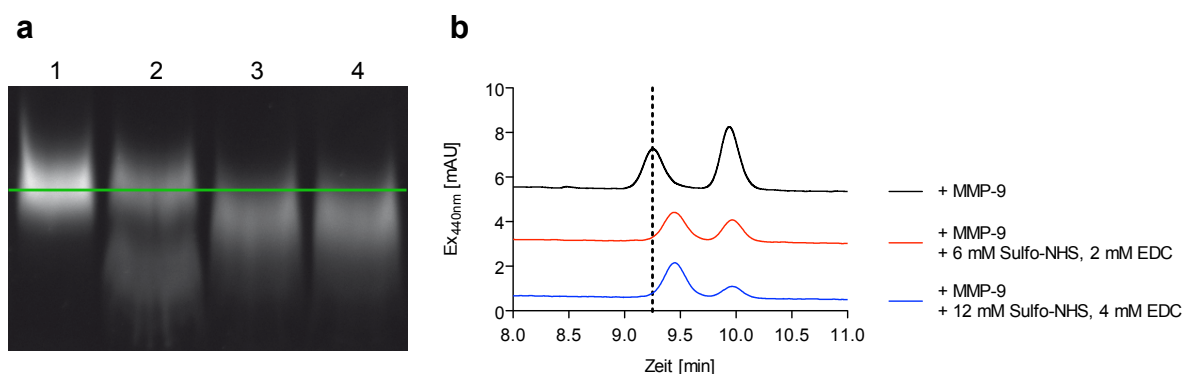


Abbildung 4.51: Untersuchung des Einflusses von EDC und Sulfo-NHS auf die enzymatische Spaltung des Peptid-PEG-Konjugats MMP(LysArgGly)-PEG5000 (K6) mittels SDS-PAGE (a) und HPLC (b). **SDS-PAGE:** (1) K6 (2) K6 + MMP-9 (3) K6 + Sulfo-NHS / EDC + MMP-9 (4) K6 + Sulfo-NHS / EDC + MMP-9. Durch die Enzymzugabe zum reinen Konjugat wurde ein Teil des Konjugats gespalten und der Fluorescein-tragende Peptid-PEG-Rest wurde als zweite Bande sichtbar (2). Nach der Inkubation des Konjugats mit EDC und Sulfo-NHS veränderte sich das Konjugat und somit auch das Laufverhalten. Das veränderte Konjugat wanderte schneller durch das Gel (3, 4) als das unbehandelte Konjugat (1, grüne Linie). **HPLC:** Die Retentionszeit des Konjugats veränderte sich ebenfalls nach der Behandlung und das veränderte Konjugat (blau, rot, erster Peak) eluierte später als das unbehandelte Konjugat (schwarz, erster Peak, gestrichelte Linie). Das Produkt der enzymatischen Spaltung im Falle der Sulfo-NHS/EDC-Proben lag in deutlich geringerer Ausbeute vor (blau, rot) als im Fall des unbehandelten Konjugats (schwarz).

(II) Enzymhemmung durch Sulfo-NHS

Eine mögliche Enzymhemmung durch bei der Kopplungsreaktion freiwerdendes Sulfo-NHS wurde anhand von elektrostatisch beschichteten PSOP untersucht. VSOP wurden dafür mit dem Konjugat MMP(Lys)-PEG5000 (K5) elektrostatisch beschichtet und mit Sulfo-NHS (in Enzympuffer gelöst) versetzt. Als Referenz diente die gleiche Partikelsuspension ohne freies Sulfo-NHS. Nach Zugabe des Enzympuffers wurden die Partikel über zwei Stunden mittels dynamischer Lichtstreuung und Fluoreszenzspektroskopie gemessen. Im Anschluss daran erfolgte die Zugabe des Enzyms zur Aktivierung der Partikel. Die Messung sowie die Vergleichsmessung elektrostatisch beschichteter PSOP ohne Sulfo-NHS sind in Abbildung 4.52 dargestellt. Während die PSOP, welche kein Sulfo-NHS enthielten, bereits kurz nach der Enzymzugabe deutlich an Größe zunahm und letztlich aggregierten, blieb die Aktivierung der PSOP in Anwesenheit des freien Sulfo-NHS aus. Die Größenzunahme setzte verzögert ein und erst nach ca. einer Stunde nach Enzymzugabe stieg der Durchmesser von 30-40 nm auf ca. 100 nm an. Außerdem war die messbare Fluoreszenz und der Anstieg der Fluoreszenz sowohl vor als auch nach der Enzymzugabe verringert. Sie stieg nach der Enzymzugabe von ca. 10 % auf ca. 15 % an. Die Ergebnisse lassen die Annahme zu, dass das Enzym durch Sulfo-NHS gehemmt wird und bestätigen einen Einfluss von Sulfo-NHS auf das Substrat bzw. Fluorescein durch eine mögliche Nebenreaktion (deutlich geringere messbare Fluoreszenz in Enzympuffer).

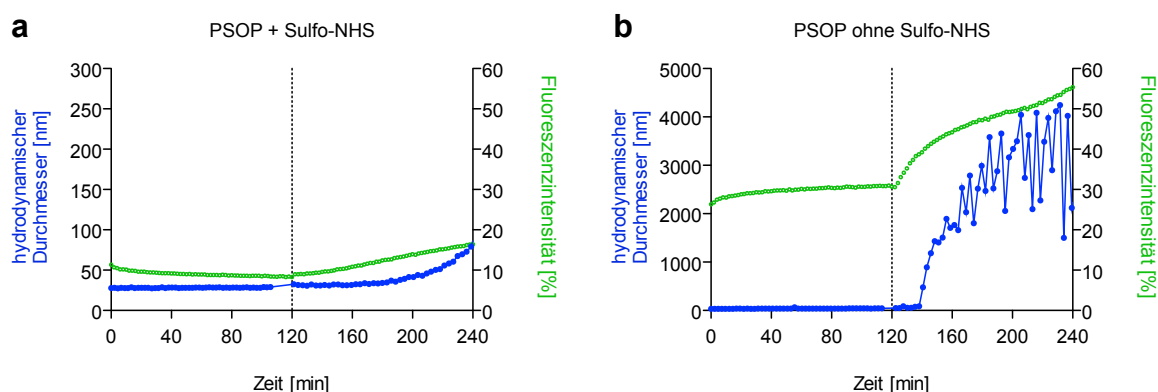


Abbildung 4.52: Elektrostatisch beschichtete PSOP mit 20 MMP(Lys)-PEG5000 (K5) in Enzympuffer und nach Enzymzugabe (vertikale Punktlinie) in Anwesenheit von freiem Sulfo-NHS (a) und ohne Zusatz von freiem Sulfo-NHS (b). Durch die Anwesenheit des freien Sulfo-NHS blieb die enzymatische Aktivierung aus. Weder die Fluoreszenz noch die Größe stiegen nach Zugabe des Enzyms stark an. Lag kein freies Sulfo-NHS vor, wurden die Partikel nach der Enzymzugabe schnell größer und aggregierten. Die Fluoreszenz stieg außerdem von 30 % auf ca. 55 % an.

Erläuterungen der Achsenbeschriftungen und Messbedingungen siehe Tabelle 4.8.

(III) Sterische Hinderung des Enzyms

Ausgehend vom dritten Syntheseansatz (Reinigung der aktivierten VSOP sowie der kovalent beschichteten PSOP) wurden neben den oben beschriebenen Verhältnissen von 20 Konjugaten pro VSOP noch weitere Verhältnisse getestet und die erhaltenen PSOP hinsichtlich ihrer enzymatischen Aktivierbarkeit untersucht. Dadurch sollte analysiert werden, inwiefern die PEG-Hülle die Schnittstelle abschirmt und so die enzymatische Aktivierung der PSOP gehemmt wird. Außerdem sollte so Einfluss auf die Anordnung der polykationischen Kopplungsdomäne, und folglich der Schnittstelle, auf den VSOP genommen werden. Abbildung 4.53 zeigt die Ergebnisse der enzymatischen Aktivierung für kovalent beschichtete PSOP mit 20, 10 und 5 MMP(Lys)-PEG5000 (K5) pro VSOP (Abbildung 4.53a-d) sowie mit 20 und 5 MMP(LysArgGly)-PEG5000 (K6) pro VSOP (Abbildung 4.53e, f).

Bei den mit MMP(Lys)-PEG5000 (K5) beschichteten PSOP bewirkte die Enzymzugabe bei allen getesteten Verhältnissen einen Anstieg der Fluoreszenz. Der deutlichste Anstieg war bei 20 Konjugaten pro VSOP zu beobachten und die Fluoreszenz stieg von 10 auf 35 % an. Bei 10 Konjugaten bewirkte die Enzymzugabe einen Anstieg auf ca. 20 % der möglichen messbaren Fluoreszenz und bei 5 Konjugaten lag die messbare Fluoreszenz leicht unter 20 %. Bei der Größenmessung unterschieden sich insbesondere die Ergebnisse der PSOP mit 5 Konjugaten. Während bei 20 und 10 Konjugaten pro VSOP die Größe nur geringfügig anstieg, wurde bei den PSOP mit 5 Konjugaten nach Enzymzugabe eine langsame Größenzunahme bis über 1000 nm gemessen. Die Inkubation der PSOP mit 10 und 5 Konjugaten in Enzympuffer bewirkte jedoch bereits eine größere Streuung in der Größenmessung, als dies bei den PSOP mit 20 Konjugaten der Fall war. Die Größe der mit 5 Konjugaten beschichteten PSOP nahm bereits im Enzympuffer zu und der hydrodynamische Durchmesser stieg von 27 nm auf über 100 nm an.

Die mit dem Konjugat MMP(LysArgGly)-PEG5000 (K6) beschichteten PSOP konnten durch die Enzymzugabe nicht aktiviert werden (Abbildung 4.53e, f). Bei 5 Konjugaten pro VSOP konnte ein Größenanstieg auf ca. 100 nm beobachtet werden, ein Anstieg der Fluoreszenz war nicht messbar. Mit dem Konjugat MMP(LysArgGly)-PEG5000 (K6) wurde ebenfalls zu dem Verhältnis aus 20 und 5 Konjugaten pro VSOP das Verhältnis aus 10 Konjugaten pro VSOP getestet. Dabei aggregierten die Partikel jedoch immer bereits während der Synthese.

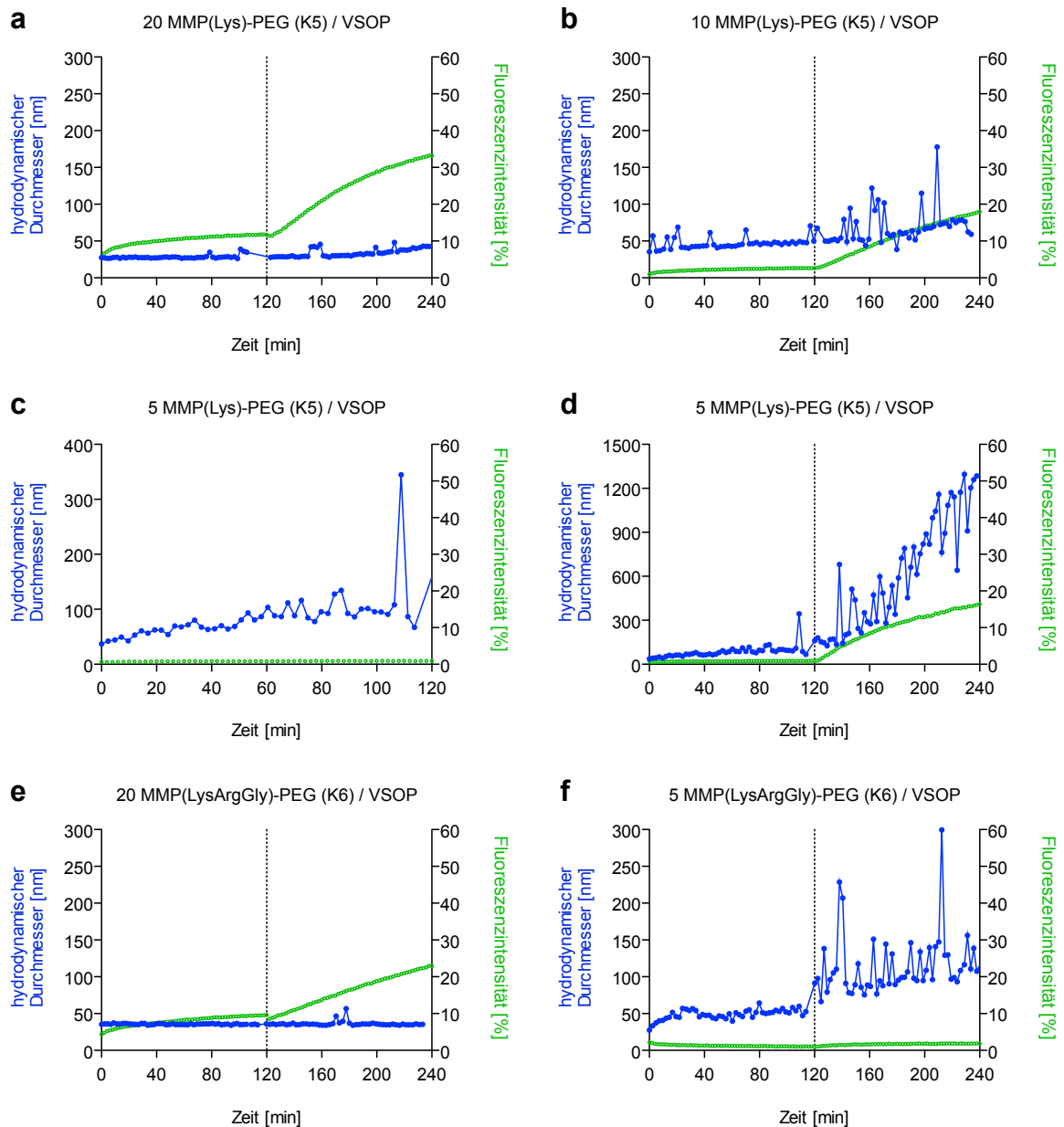


Abbildung 4.53: Untersuchung der enzymatischen Aktivierbarkeit kovalent beschichteter PSOP mit 20, 10 und 5 MMP(Lys)-PEG5000 (K5) (a-d) bzw. mit 20 und 5 MMP(LysArgGly)-PEG5000 (K6) (e, f) (Reinigung der aktivierten VSOP und der finalen PSOP). Die mit 10 und 20 MMP(Lys)-PEG5000 beschichteten PSOP ließen sich durch die Enzymzugabe nicht aktivieren (**a**, **b**). Bei 5 Konjugaten pro VSOP stieg der Durchmesser während der Inkubation im Enzympuffer von 27 nm auf über 100 nm (**c**) und nach Enzymzugabe auf über 1000 nm an (**d**). Die mit MMP(LysArgGly)-PEG5000 beschichteten PSOP ließen sich ebenfalls durch die Enzymzugabe nicht aktivieren (**e**, **f**). Bei 5 Konjugaten pro VSOP war während der Inkubation im Enzympuffer ein langsamer Größenanstieg von 27 nm auf 52 nm und nach der Enzymzugabe ein weiterer Größenanstieg von 52 nm auf 122 nm zu beobachten (**f**). Die Enzymzugabe ist jeweils durch eine vertikale Punktlinie markiert. Erläuterungen der Achsenbeschriftungen und Messbedingungen siehe Tabelle 4.8.

4.2.3. Diskussion

4.2.3.1. Synthese der Peptid-PEG-Konjugate

Die gewählten Synthesebedingungen und Methoden zur Charakterisierung ermöglichten, dass die gewünschten Peptid-PEG-Konjugate erfolgreich hergestellt, gereinigt und analysiert werden konnten. Aufgrund der verwendeten Sequenz und der bevorzugten Reaktion von freien Aminogruppen mit dem Succinimidylester [88], verlief die Reaktion der argininreichen Peptide mit NHS-PEG5000 ortsspezifisch und ausschließlich über die vorgesehenen Koppelungsstellen. Die ortsspezifische Reaktion ermöglichte den Einsatz eines hohen Überschusses an NHS-PEG5000, wodurch eine nahezu vollständige Umsetzung der kostenintensiven Peptide erreicht wurde (Abbildung 4.30, Abbildung 4.34). Die PEGylierung der lysinreichen Peptide über die freie Thiolgruppe mit der Maleimidgruppe des Mal-PEG5000 erfolgte indes stöchiometrisch, um die Nebenreaktion der primären Aminogruppen mit der Maleimidgruppe zu verhindern (Abbildung 4.38) [106, 107]. Um die Dimerisierung der Peptide über die Thiolgruppen zu verhindern, wurde das Peptid bei -20 °C gelagert und erst kurz vor der Umsetzung im HEPES-Puffer (pH 7,0) gelöst. Insbesondere beim Peptid P6, das neben den Lysinen auch noch Arginine enthielt, konnte die Dimerisierung des Peptids in der SDS-PAGE gut beobachtet werden (Abbildung 4.39b, Spur 2 und 3). Die Untersuchung der Dimerisierung war hilfreich für die Beurteilung der Verfügbarkeit der Thiolgruppen, welche für die PEGylierung genutzt wurden. Durch die PEGylierung wurden ferner die Wechselwirkungen der polykationischen Peptide mit dem genutzten Säulenmaterial verringert, was wiederum die Reinigung der Konjugate mittels Größenausschlusschromatographie ermöglichte (Abbildung 4.33, Abbildung 4.37). Die polykationische Peptidkette beeinflusste indes das Laufverhalten der Peptide sowie der Konjugate in der SDS-PAGE, weshalb der mitgeführte Größenmarker lediglich als interner Standard diente. Aufgrund der Polydispersität des eingesetzten PEG erschienen außerdem die Banden der Konjugate in der SDS-PAGE nicht als definierte Banden, sondern breit und verschmiert (Abbildung 4.31, Abbildung 4.35). Die Methode eignete sich dennoch zur Charakterisierung der Konjugate, insbesondere in Korrelation mit den Ergebnissen der MALDI/TOF-MS (Abbildung 4.32), da deutlich unterschieden werden konnte zwischen Konjugaten mit unterschiedlicher Anzahl an PEG-Ketten.

4.2.3.2. Synthese und Charakterisierung der PSOP

Bei der Synthese der PSOP sollten analog zu der AnxA5-VSOP-Synthese verschiedene Kriterien erfüllt werden, um von einer optimalen Beschichtung ausgehen zu können. Für eine erfolgreiche *in-vivo*-Anwendung und spezifische Anreicherung im Zielgewebe müssen die PSOP jedoch insbesondere zwei Kriterien erfüllen. Zum einen müssen die Konjugate fest auf der Partikeloberfläche gebunden sein. Durch einen Verlust der Konjugate würden die Partikel ihre Enzym-Aktivierungsfunktion und ihre *stealth*-Eigenschaften, die durch die PEG-Hülle

vermittelt werden, verlieren. Dadurch würden die Partikel unspezifisch angereichert, während die gewünschte Anreicherung im Zielgewebe ausbliebe. Zum anderen müssen die Partikel spezifisch durch das darzustellende Enzym aktiviert werden können. Nach der Bindung der Konjugate auf der Partikeloberfläche muss also gewährleistet sein, dass die Schnittstelle frei zugänglich ist und das Enzym nicht gehindert wird. Im Vergleich zur der AnxA5-VSOP-Synthese ist der Erhalt der Konformation nur bedingt relevant. Da das eingesetzte Peptid vermutlich als flexible Kette vorliegt, muss bei der Reaktionsführung eine mögliche Konformationsänderung und damit ein einhergehender Aktivitätsverlust nicht berücksichtigt werden. Vielmehr musste der Abstand der Schnittstelle vom Partikelkern und die Abschirmung durch die PEG-Ketten untersucht werden, um eine sterische Hemmung des Enzyms auszuschließen. Darüber hinaus mussten mögliche Nebenreaktionen des Konjugats untersucht werden, um zu gewährleisten, dass dieses auch nach der Bindung noch als Substrat vorliegt.

Neben den elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen polykationischem Peptid und der negativ geladenen Citrathülle spielen bei der Anbindung des Konstrukts auf den VSOP vermutlich auch andere Kräfte eine Rolle. So bilden sich z. B. sicherlich auch Wasserstoffbrücken aus, weshalb korrekterweise nicht nur von einer elektrostatischen Anbindung gesprochen werden dürfte. Im Folgenden soll dies jedoch nicht weiter diskutiert werden, so dass der Einfachheit halber auch weiterhin lediglich elektrostatische Wechselwirkungen angenommen werden.

Untersuchung des optimalen Verhältnisses aus Konjugat zu VSOP

Die Berechnung aus Konjugat-Anzahl zu VSOP basierte auf der Annahme, dass die eingesetzten VSOP über 6500 Eisenatome pro Partikel verfügten (Kapitel 6.2. VSOP). Über Messung der Konjugat- und der Eisenkonzentration der eingesetzten Lösungen / Suspensionen konnte so das Verhältnis aus Konjugat und VSOP berechnet werden. Zu beachten ist, dass die Anzahl der Eisenatome pro Partikel aus dem mittleren Kerndurchmesser ermittelt wurde und nicht die Polydispersität der VSOP wiedergibt. Im optimalen Fall ist die Polydispersität gering und auf jedes Partikel, kann die gleiche Konjugatmenge gebunden werden. Auch wenn der berechnete Wert fehlerbehaftet ist, da er lediglich auf einer Abschätzung basiert, so half er doch bei der Vorstellung der resultierenden PSOP, der Planung der Experimente, insbesondere der Verhältnisse von Konjugat zu VSOP, sowie bei der Charakterisierung und Diskussion der Ergebnisse. Die berechneten Verhältnisse konnten ferner gut auf ein Modell (Abbildung 4.27) übertragen werden und passten sehr gut zu den Ergebnissen der Größen- und Fluoreszenzmessungen. Die Messung der Verhältnisse sollte ferner nicht als harter Messwert sondern lediglich als Anhaltspunkt angesehen werden, da bei der elektrostatischen Beschichtung nicht gesteuert werden kann, wie sich die Konjugate auf der Oberfläche anordnen. Dies ist ein Prozess, der sich in gewissem Umfang durch die unterschiedlichen Konjugatkonzentrationen beeinflussen, aber sicherlich nicht vollständig steuern lässt.

Die Untersuchung des optimalen Verhältnisses erfolgte durch Zugabe der VSOP-Suspension in verschiedene konzentrierte Konjugatlösungen, wobei sich elektrostatisch beschichtete PSOP bildeten. Die Größen- und Fluoreszenzmessungen sollten darüber Aufschluss geben, wie viel Konjugat auf der Partikeloberfläche binden muss (minimal nötige Konjugatmenge), damit einheitliche Partikel entstehen (gleichbleibender Durchmesser), und wie viel auf der Partikeloberfläche gebunden werden kann (maximal mögliche Konjugatmenge), bevor ein Großteil der Konjugate frei in Lösung vorliegt oder nur über ein kurzes Stück des polykationischen Peptids an die negativ geladene Citrathülle gebunden ist (ansteigende Fluoreszenz). Bei vollständiger Fluoreszenzlöschung sollten sich die Farbstoffe noch in räumlicher Nähe zueinander sowie nah am Metallkern befinden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Konjugatmenge auf die Oberfläche passt. Binden die Konjugate hingegen nur über einen Teil der polykationischen Sequenz, könnte dies zu einem Stabilitätsverlust führen. Um unspezifische Wechselwirkungen oder eine ungewollte Aggregation zu vermeiden, sollte die Partikeloberfläche jedoch vollständig abgedeckt sein. Dieser Zustand wurde angenommen, wenn sich der Partikeldurchmesser mit höheren Verhältnissen an Konjugat zu VSOP nicht mehr änderte. Solange auf der Partikeloberfläche noch genügend Raum für Konjugat vorhanden ist, würde sich dieses an die Oberfläche anlagern. Allerdings kann nicht grundsätzlich von einer Zunahme des Durchmessers mit höherem Konjugatanteil gesprochen werden, da sich bei sehr geringer Beschichtung auch mehrere Partikel zusammenlagern können. Sowohl für die Größen- als auch für die Fluoreszenzmessung war es von Bedeutung, dass auch hohe Verhältnisse an Konjugat zu VSOP untersucht wurden, um so einen richtigen Eindruck von der optimalen Beschichtung zu erhalten.

Um lediglich die Wechselwirkung zwischen Konjugat und VSOP zu untersuchen und den Effekt von Salzen auszuschließen, wurden die PSOP in Wasser hergestellt und die Größen- und Fluoreszenzmessungen erfolgten ebenfalls in Wasser. Für alle als Monomer vorliegenden Konjugate (K2, K3, K5, K6) wurden Verhältnisse von 3-30 Konjugaten pro VSOP getestet. Wegen der Verdopplung der Peptidsequenz wurden beim Dimer geringere Verhältnisse getestet (1-12 Konjugate pro VSOP). Erwartungsgemäß wurde bei allen untersuchten Konjugaten beobachtet, dass bis zu einem bestimmten Verhältnis aus Konjugat zu VSOP die Fluoreszenz vollständig gelöscht wurde und die Größen erst ab einem bestimmten Verhältnis relativ konstant blieben. Wurden die VSOP z. B. mit nur 10 Konjugaten MMP(Arg)-PEG5000 (K2) beschichtet, wiesen diese mit 48 nm einen größeren hydrodynamischen Durchmesser als mit 15 Konjugaten pro VSOP auf (Abbildung 4.40b). Dieser Effekt beruhte möglicherweise auf der oben angesprochenen Zusammenlagerung mehrerer Partikel aufgrund einer unvollständig abgedeckten VSOP-Oberfläche. Beim Konjugat MMP(Arg)-(PEG5000)₂ (K3) trat der beschriebene Größeneffekt hingegen nicht auf (Abbildung 4.40d), was auf die zweite PEG-Kette am Konjugat zurückgeführt wurde. Bei gleicher Konjugatmenge pro VSOP schirmen hier doppelt soviel PEG-Ketten das Partikel ab, was schneller zu einer sterischen Stabilisierung führen kann. Noch deutlicher wird die Abschirmung der VSOP durch die PEG-Ket-

ten bei der Beschichtung mit dem Dimer (K4). Bereits 3 Konjugate reichten aus und die Größe änderte sich nicht mehr (Abbildung 4.40f). Bei gleichem Konjugatverhältnis schirmen beim Dimer viermal soviel PEG-Ketten das Partikel ab, wie es beim Konjugat MMP(Arg)-PEG5000 (K2) der Fall ist. Das sich jedoch auch die unterschiedliche Peptidsequenz auf die Anlagerung auswirkte, zeigt sich in den Messungen der lysinreichen Konjugate MMP(Lys)-PEG5000 (K5) und MMP(LysArgGly)-PEG5000 (K6), welche beide jeweils über eine PEG-Kette verfügen (Abbildung 4.41). Insbesondere die Beschichtung mit geringeren Mengen des Konjugats MMP(LysArgGly)-PEG5000 (K6) erzielte PSOP, dessen Größen stark schwankten, während sich die Beschichtung mit ansteigenden Mengen des Konjugats MMP(Lys)-PEG5000 (K5) lediglich in einem Anstieg der Größe äußerte. Da das Konjugat MMP(LysArgGly)-PEG5000 (K6) ebenso wie das Konjugat MMP(Arg)-PEG5000 (K2) in der Peptidsequenz über Arginine verfügte, wurde die basischere Seitenkette der Aminosäure als Ursache angenommen. Die Seitenkette des Arginins hat mit 12,5 einen höheren pK_s -Wert als die Seitenkette des Lysins (pK_s 10,8) und liegt somit im Vergleich stärker protoniert vor [178], wodurch eine Zusammenlagerung der Partikel unter Umständen begünstigt wurde.

Auch wenn die oben diskutierten Ergebnisse lediglich als Anhaltspunkte herangezogen werden können, da man sich die Vorgänge an der Partikeloberfläche nur modellhaft vorstellen kann, so halfen die Messungen einen Eindruck von der Beschichtung zu erhalten. Schließlich beeinflussten schon geringe Abweichungen in den Konjugaten die Beschichtung der VSOP und die daraus resultierende sterische Stabilisierung. Ausgehend von den optimal erscheinenden Verhältnissen (Tabelle 4.9), wurden daher auch noch weitere Verhältnisse getestet und ausgewertet.

Elektrostatisch beschichtete PSOP mit argininreichen Peptid-PEG-Konjugaten

Analog zu den Untersuchungen zur Bestimmung des optimalen Verhältnisses aus Konjugat zu VSOP, erfolgte die Herstellung der elektrostatisch beschichteten PSOP in Wasser. Erst nach der Ausbildung der PSOP bzw. erst kurz vor Untersuchung der PSOP wurden die nötigen Pufferlösung zugesetzt. Für die elektrostatische Beschichtung wurden drei verschiedene Konjugate getestet (Abbildung 4.28). Als einfachstes Konjugat wurde das MMP(Arg)-PEG5000 (K2) eingesetzt. Über die argininreiche Peptidsequenz erfolgte die Anlagerung an die VSOP und durch die PEG-Kette wurde das Partikel sterisch stabilisiert. Das zweite Konjugat (MMP(Arg)-(PEG5000)₂, K3) verfügte über eine vergleichbare argininreiche Peptidsequenz, aber über zwei PEG-Ketten. Dies sollte eine höhere sterische Stabilisierung bei gleicher Aktivierbarkeit sowie bessere *stealth*-Eigenschaften und somit eine längere Zirkulationsdauer der PSOP im Blut bewirken. Beim dritten argininreichen Konjugat MMP(Arg)-(PEG5000)₂-Cys-Dimer (K4) sollte neben der verlängerten Zirkulationsdauer, durch die hohe Anzahl der PEG-Ketten, insbesondere die Wechselwirkung des Peptids mit dem Partikel durch eine kumulative Bindung verstärkt werden, um so eine Ablösung der Konjugate *in vivo*

zu verhindern. Dafür wurde eine ähnliche Peptidsequenz wie bei MMP(Arg)-PEG5000 (K2) und MMP(Arg)-(PEG5000)₂ (K3) gewählt, nur dass diese zusätzlich über ein Cystein für eine Disulfidbindung verfügte und so die argininreiche Peptidsequenz verdoppelt würde (längere Bindungsdomäne).

Als ein Maß für die Stabilität der hergestellten PSOP wurden Messungen herangezogen, bei denen die PSOP mit ansteigenden NaCl-Mengen versetzt wurden (Abbildung 4.42). Die gewählten Bedingungen unterschieden sich zwar stark von den *in-vivo*-Bedingungen, sollten aber dennoch einen gewissen Informationsgewinn liefern. Durch die Zugabe der NaCl-Lösungen konnte zudem ein interessanter Effekt beobachtet werden. So wurde ein gestufter Anstieg der Fluoreszenz bei den mit den Konjugaten MMP(Arg)-PEG5000 (K2) und MMP(Arg)-(PEG5000)₂ (K3) beschichteten PSOP gemessen. Im Gegensatz dazu nahm der hydrodynamische Durchmesser der PSOP ab, auch wenn er nicht den ursprünglichen Durchmesser der unbeschichteten VSOP erreichte. Die NaCl-Zugabe beeinflusste somit definitiv die Wechselwirkungen des Konjugats mit der Partikeloberfläche. Was schwierig abzuschätzen ist, ist inwiefern wirklich ein irreversibles Ablösen der Konjugate hervorgerufen wurde oder ob sich lediglich der Dissoziationsprozess veränderte. Die Konjugate sind auf der Oberfläche beweglich und können sich zudem auch nur mit einer Seite ablösen, während die andere Seite noch an der Partikeloberfläche gebunden ist. Es ist grundsätzlich auch vorstellbar, dass bereits in Wasser die Konjugate nicht dauerhaft auf der Oberfläche gebunden sind, sondern dass sich diese ablösen und wieder anbinden und sich somit in einem Gleichgewicht befinden. Diese Annahme wird bestätigt durch die Beobachtung, dass bereits in Wasser eine Aggregation der Partikel auftrat, wenn diese über einen längeren Zeitraum aufbewahrt wurden. Betrachtet man nun erneut die Fluoreszenz- und Größenmessung der mit MMP(Arg)-PEG5000 (K2) und MMP(Arg)-(PEG5000)₂ (K3) beschichteten PSOP, sieht man, dass sich bei den beiden höchsten Salzkonzentrationen ein leichtes Plateau andeutet, was auf einen relativ stabilen Zustand der PSOP schließen lässt (Abbildung 4.42a, b). Es ist nun also vorstellbar, dass sich ein Teil der Konjugate abgelöst hat, während wiederum der andere Teil über ein längeres Stück des Peptids an die Partikeloberfläche gebunden hat und somit zunächst fester an der Oberfläche bindet. Dass trotzdem mit 15 Konjugaten pro VSOP gearbeitet wurde, lag daran, dass die PSOP mit niedrigen Konjugatmengen in Wasser deutlich schneller aggregierten als es bei höheren Verhältnissen der Fall war. Auch wenn der beobachtete Effekt durch die Messungen nicht vollständig erklärt wurde und man keine eindeutige Voraussage über das Dissoziationsverhalten der Konjugate *in vivo* treffen kann, kann festgehalten werden, dass die mit MMP(Arg)-PEG5000 (K2) und MMP(Arg)-(PEG5000)₂ (K3) beschichteten PSOP durch NaCl stark beeinflusst wurden und daher die Stabilität dieser PSOP *in vivo* anzuzweifeln ist.

Einen scheinbar geringeren Einfluss hatte der ansteigende NaCl-Gehalt auf die mit dem MMP(Arg)-(PEG5000)₂-Cys-Dimer (K4) beschichteten PSOP, was möglicherweise auf einen

größeren Chelat-Effekt des Konjugats zurückzuführen ist (Abbildung 4.42c). Zu berücksichtigen ist hier sicherlich auch das geringere Verhältnis aus Konjugat zu VSOP, wodurch sich von vornherein das Konjugat anders auf der Partikeloberfläche anordnen konnte, als es bei den oben beschriebenen Konjugaten (K2, K3) der Fall war. Allerdings wurden mit einem Peptid bereits 4 PEG-Ketten auf die Partikeloberfläche gebracht, welche sich ebenfalls auf die Anordnung der Konjugate auswirkte. Festzuhalten bleibt, dass sich der hydrodynamische Durchmesser der PSOP erst bei sehr hohen NaCl-Konzentrationen änderte. Was sich zunächst ebenfalls kaum änderte, war die messbare Fluoreszenz. Diese Effekte können als Indizien für eine geringere Ablösung der Konjugate und somit eine vermutlich höhere Stabilität dieser PSOP *in vivo* betrachtet werden. Durch Messung der Bluthalbwertszeiten *in vivo* kann diese Aussage zukünftig überprüft werden.

Für die Untersuchung der enzymatischen Aktivierbarkeit wurden die PSOP zunächst über zwei Stunden in Enzympuffer gemessen und dann mit dem Enzym MMP-9 versetzt und erneut über einen Zeitraum von zwei Stunden gemessen. Die Inkubation in Enzympuffer vor der Enzymzugabe sollte, zusätzlich zu den Messungen der PSOP mit ansteigenden NaCl-Mengen, Auskunft darüber geben, inwiefern sich die enthaltenen Ionen (in physiologischen Konzentrationen) auf eine mögliche Dissoziation der Konjugate und somit die Stabilität der Bindung auswirken. Die Messungen sollten somit weitere Indizien für das Verhalten der PSOP unter physiologischen Bedingungen liefern.

Die Inkubation der mit MMP(Arg)-PEG5000 (K2) und MMP(Arg)-(PEG5000)₂ (K3) beschichteten PSOP im Enzympuffer bewirkte, dass bereits ein großer Anteil der Fluoreszenz nicht mehr gelöscht wurde (Abbildung 4.43). Ähnlich wie NaCl scheinen die Puffersubstanzen die Bindung der Konjugate auf der Partikeloberfläche zu beeinflussen, so dass sich diese von der Partikeloberfläche entfernten. Eine Aggregation der PSOP innerhalb der zwei Stunden, infolge einer möglichen Ablösung der Konjugate, bewirkten die Puffersubstanzen jedoch nicht. Die Zugabe des Enzyms bewirkte hingegen dann die gewünschte Aktivierung und folglich Aggregation der mit MMP(Arg)-PEG5000 (K2) und MMP(Arg)-(PEG5000)₂ (K3) beschichteten PSOP. Im Falle der argininreichen Konjugate blieb der Fluoreszenzfarbstoff infolge der enzymatischen Spaltung des Peptid-PEG-Rests auf der Partikeloberfläche gebunden und war bei eintretender Sedimentation der Partikel nicht mehr detektierbar, was sich in einer Abnahme der messbaren Fluoreszenz äußerte. Die mit MMP(Arg)-PEG5000 (K2) beschichteten PSOP wurden darüber hinaus schneller aktiviert als die Vergleichsproben mit MMP(Arg)-(PEG5000)₂ (K3). Dies wurde auf die dichtere PEG-Hülle der PSOP mit MMP(Arg)-(PEG5000)₂ (K3) zurückgeführt. Beide Konjugate wurden in einem Verhältnis von 15 Konjugaten pro VSOP eingesetzt. Die mit MMP(Arg)-(PEG5000)₂ (K3) beschichteten PSOP wiesen somit doppelt soviel PEG-Ketten auf. Die Anordnung der PEG-Ketten war zwar so gewählt, dass die zwei PEG-Ketten gemeinsam abgespalten wurden, jedoch besonders am Anfang der Aktivierung konnten die übrigen PEG-Ketten vermutlich den Verlust der

ersten PEG-Ketten gut ausgleichen und die Partikel verfügten weiterhin über eine sterische Stabilisierung. Zusätzlich schien die Schnittstelle für die MMP-9 stärker sterisch abgeschirmt zu sein, wodurch sich die Aktivierung ebenfalls verzögerte.

Die mit dem MMP(Arg)-(PEG5000)₂-Cys-Dimer beschichteten PSOP konnten hingegen durch das Enzym nicht aktiviert werden (Abbildung 4.44). Der Anstieg der Fluoreszenz durch das Suspendieren der PSOP im Enzympuffer war so gering, dass er als vernachlässigbar einzustufen ist, stellt jedoch ebenfalls einen Hinweis auf eine wesentlich höhere Stabilität der Beschichtung dar. Nach der Enzymzugabe änderte sich die messbare Fluoreszenz ebenfalls nur sehr geringfügig. Ähnlich verhielt es sich mit der Größe der Partikel und auch am Folgetag konnte noch keine Aggregation der Partikel beobachtet werden. Um zu untersuchen, inwiefern die ausbleibende Aktivierung auf eine sterische Hinderung des Enzyms zurückzuführen war, wurden neben den anfänglich favorisierten 3 Konjugaten (12 PEG5000) pro VSOP weitere Verhältnisse getestet und die Größenänderung verfolgt (Abbildung 4.45). Durch eine geringere gebundene Konjugatmenge (2 Konjugate \triangleq 8 PEG5000) sollte sich die sterische Abschirmung durch die PEG-Ketten minimieren. Bei einem größeren Verhältnis aus Konjugat zu VSOP (6 Konjugate \triangleq 24 PEG5000 bzw. 9 Konjugate \triangleq 36 PEG5000) sollte sich die Schnittstelle des Peptids vom Kern entfernen. In allen untersuchten Fällen konnten die PSOP allerdings nicht aktiviert werden. Teilweise bewirkte die Enzymzugabe, dass die Größenmessungen schwankten (6 und 9 Konjugate), aber eine Aggregation trat nicht ein. Die als Dimer vorliegende Peptidsequenz schien somit aufgrund der längeren Bindungsdomäne die Bindungsstärke des Konjugats auf der Oberfläche wie gewünscht zu erhöhen, was jedoch zur Folge hatte, dass der Peptid-PEG-Rest nicht enzymatisch gespalten werden konnte. Die vorliegende Citrathülle ist darüber hinaus auch nicht beweglich wie es bei einer dextranbeschichteten Partikeloberfläche vielleicht der Fall wäre, so dass möglicherweise zu wenig Flexibilität der Peptide bzw. eine Hinderung durch die Partikeloberfläche für eine proteolytische Spaltung durch die MMP-9 vorliegt.

Kovalent beschichtete PSOP mit lysinreichen Peptid-PEG-Konjugaten

Die Synthese der kovalent beschichteten PSOP erfolgte basierend auf Ergebnissen aus der Untersuchung des optimalen Verhältnisses von Konjugat zu VSOP. Es wurde dabei angenommen, dass jedes eingesetzte Konjugat auch kovalent an der Oberfläche bindet. Der Grund dafür ist, dass die Konjugate durch die polykationische Sequenz auch elektrostatisch an der Oberfläche binden können und dadurch die kovalente Bindung ebenfalls beeinflussen. Bei einem hohen Überschuss kann wiederum nicht gesteuert werden, wie sich das Konjugat an der Oberfläche anlagert, und bindet unter Umständen nur über ein viel kürzeres Teilstück. Die Wahrscheinlichkeit, dass die vorliegende Anzahl der Konjugate beim gewünschten Verhältnis bindet, wird außerdem dadurch erhöht, dass die Konjugate über mehrere Lysine verfügen, die mit der Citrathülle reagieren können.

Durch die kovalente Anbindung der Konjugate sollte erreicht werden, dass diese fest an der Partikeloberfläche gebunden sind und die Ablösung *in vivo* verhindert wird. Es wurden dafür zwei lysinreiche Peptid-PEG-Konjugate untersucht (Abbildung 4.36). Das Konjugat MMP(Lys)-PEG5000 (K5) verfügte über zehn aufeinanderfolgende Lysine, welche über ihre primären Aminogruppen kovalent an die Citrathülle gebunden werden können. An die Lysinsequenz schlossen sich 4 Glycine als Abstandhalter an, bevor die Schnittstelle folgte. Das zweite Konjugat MMP(LysArgGly)-PEG5000 (K6) verfügte neben den Lysinen außerdem über vier Arginine, welche nicht kovalent an die Citrathülle gebunden werden können und deren Guanidingruppen somit als positiv geladene Gruppen auch nach der Reaktion von Lysinen mit Citratgruppen vorliegen. So sollte gewährleistet werden, dass auch nach der Reaktion und insbesondere nach der enzymatischen Aktivierung eine gemischt geladene Oberfläche für eine schnelle Aggregation vorliegt. Das zweite Konjugat hatte mit 6 Glycinen zudem eine etwas längere Glycinkette vor der Schnittstelle, um den Abstand zwischen Bindungsdomäne und Schnittstelle zu vergrößern und so eine mögliche sterische Hinderung der MMP-9 zu reduzieren. Beide Konjugate trugen auch in diesem Fall den Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein. Dieser wurde allerdings so positioniert, dass er mit dem Peptid-PEG-Rest abgespalten wird. Während also die Größenmessungen bei erfolgreicher enzymatischer Aktivierung ebenso wie bei den mit MMP(Arg)-PEG5000 (K2) und MMP(Arg)-(PEG5000)₂ (K3) beschichteten PSOP verlaufen sollte, würde die Fluoreszenz hingegen zunehmen.

Als Referenz wurden die VSOP mit den lysinreichen Konjugaten MMP(Lys)-PEG5000 (K5) und MMP(LysArgGly)-PEG5000 (K6) ebenfalls elektrostatisch beschichtet. Die so hergestellten PSOP verhielten sich sehr ähnlich zu den mit MMP(Arg)-PEG5000 (K2) beschichteten PSOP (Abbildung 4.47). Die Ursachen für den Fluoreszenzanstieg und die Größenabnahme sind vergleichbar mit den Ursachen der Ergebnisse der PSOP, welche mit MMP(Arg)-PEG5000 (K2) beschichtet wurden und sollen an dieser Stelle nicht weiter diskutiert werden. Die Messung im Enzympuffer und nach der Enzymzugabe zeigte, dass die PSOP ebenfalls schnell aktiviert wurden. Wie oben beschrieben, bewirkte die enzymatische Spaltung des Peptid-PEG-Restes einen weiteren Anstieg der Fluoreszenz. Die Untersuchung der enzymatischen Aktivierung belegte somit, dass die eingesetzten Konjugate grundsätzlich durch das Enzym MMP-9 gespalten wurden.

Deutlich andere Ergebnisse liegen bei den PSOP vor, welche kovalent mit den lysinreichen Konjugaten beschichtet wurden und bei denen auf jegliche Reinigungsschritte verzichtet wurde (Abbildung 4.48). Sowohl der hydrodynamische Durchmesser als auch die messbare Fluoreszenz änderten viel weniger, als es bei den vergleichbaren elektrostatisch beschichteten PSOP zu beobachten war. Dies könnten Anzeichen für eine stabile Bindung des Konjugats auf der Partikeloberfläche sein. Eine spezifische Aktivierung der PSOP durch die Zugabe des Enzyms konnte jedoch in beiden Fällen nicht erreicht werden. Da die aktivierten VSOP und die erhaltenen PSOP nicht gereinigt wurden, konnte an der Stelle nicht ausge-

schlossen werden, dass die geringe Größenänderung und der geringe Fluoreszenzanstieg infolge der NaCl-Zugabe sowie die ausbleibende Aktivierung der PSOP durch mögliche Nebenreaktionen des Konjugats bzw. des Farbstoffs mit Sulfo-NHS und EDC verursacht wurde. Auch eine Hemmung des Enzyms durch Sulfo-NHS und EDC musste an dieser Stelle in Betracht gezogen werden. Dies wurde untersucht, indem das Konjugat MMP(LysArgGly)-PEG5000 (K6) vor der Enzymzugabe mit Sulfo-NHS und EDC inkubiert wurde. Durch das veränderte Laufverhalten des Konjugats in der SDS-PAGE und der veränderten Retentionszeit in der HPLC konnte gezeigt werden, dass das Konjugat aus der Inkubation und somit vermutlich aus einer Reaktion mit Sulfo-NHS und EDC verändert hervorging (Abbildung 4.51). Mögliche intramolekulare Reaktionen der Lysinseitenketten mit der Carboxygruppe des Farbstoffs änderten unter Umständen die Konjugatstruktur, so dass die proteolytische Spaltung des Peptids durch die MMP-9 nicht mehr zu einer Abspaltung der PEG-Kette führte. Die Ergebnisse der HPLC zeigen ferner, dass sich der Anteil an abgespaltenem PEG mit steigendem Sulfo-NHS- und EDC-Gehalt verringerte, was neben der oben angesprochenen intramolekularen Reaktion auch durch eine Enzymhemmung verursacht worden sein konnte und eine der vorliegenden Substanzen als Inhibitor wirkt. Um eine spezifische Aktivierung durch Spaltung des Konjugats zu gewährleisten, war somit eine Reinigung der aktivierten VSOP unumgänglich.

Diese Bedingung erfüllte der zweite Syntheseansatz, bei dem die aktivierten VSOP mittels Zentrifugenfiltern gereinigt wurden. Tatsächlich änderte sich dadurch bereits das Verhalten der PSOP in NaCl-Lösungen (Abbildung 4.49). Inwiefern der abnehmende Durchmesser und die ansteigende Fluoreszenz auf eine verstärkte Dissoziation der Konjugate im Vergleich zu den ungereinigten PSOP zurückzuführen war, ist jedoch schwierig zu sagen. Möglicherweise konnte der Fluoreszenzanstieg bei den ungereinigten PSOP lediglich aufgrund von Nebenreaktionen mit EDC und Sulfo-NHS nicht beobachtet werden und erschwert somit den Vergleich. Festzuhalten bleibt, dass sich die Größe leicht änderte, aber wesentlich geringer als es bei den elektrostatisch beschichteten PSOP der Fall war. Die Größe der mit MMP(LysArgGly)-PEG5000 (K6) beschichteten PSOP ist z. B. in allen NaCl-Konzentrationen fast konstant, weshalb eine Dissoziation der Konjugate zunächst als vermindert anzusehen ist. Ferner stieg durch die Enzymzugabe die Fluoreszenz bei beiden PSOP an, was die Annahme erlaubt, dass ein Teil der Konjugate enzymatisch gespalten wurde, allerdings blieb die Aggregation der Partikel erneut aus. In Hinblick darauf wurde untersucht, inwiefern bei der Reaktion freiwerdendes Sulfo-NHS die enzymatische Aktivierung hemmt. Überschüssiges EDC und Sulfo-NHS wurden beim zweiten Syntheseansatz nach der Aktivierung der VSOP abgetrennt, aber sowohl bei der Umsetzung mit dem Konjugat als auch bei der Hydrolyse der aktivierten Carboxygruppen (Succinimidylester) geht Sulfo-NHS aus der Reaktion hervor. Die Hemmung wurde an elektrostatisch beschichteten PSOP getestet, da diese bereits erfolgreich enzymatisch aktiviert wurden (Abbildung 4.52). Tatsächlich konnten die mit Sulfo-NHS versetzten PSOP nicht mehr aktiviert werden. Sowohl der Anstieg der Fluores-

zenz als auch die Größenzunahme waren so minimal, dass kaum von einem Effekt gesprochen werden kann. Zu beobachten war jedoch von Beginn an eine deutlich geringere Fluoreszenz als bei der vergleichbaren Probe ohne Sulfo-NHS, was außerdem auf eine Wechselwirkung des Sulfo-NHS mit dem Farbstoff hindeutet.

Beim dritten Syntheseansatz, bei dem sowohl die aktivierten VSOP als auch die finalen PSOP gereinigt wurden, konnte nach den oben diskutierten Ergebnissen eine Hemmung oder Beeinflussung der enzymatischen Aktivierung durch EDC und Sulfo-NHS eher ausgeschlossen werden. Die Untersuchung der so hergestellten PSOP zeigte jedoch, dass auch diese nach der Enzymzugabe nicht aktiviert wurden (Abbildung 4.50). Bei beiden PSOP konnte ein Anstieg der Fluoreszenz gemessen werden, was eine gewisse Enzymaktivität belegt. Jedoch reichte die Enzymaktivität scheinbar nicht aus, um genügend Peptid-PEG-Reste zu spalten und so eine Aggregation der PSOP zu bewirken.

Da die geringe Aktivierbarkeit sterisch bedingt sein konnte, wurden zusätzlich zu den 20 Konjugaten pro VSOP noch geringere Verhältnisse an Konjugat getestet. Im Falle des MMP(Lys)-PEG5000 (K5) konnten sowohl mit dem 5- als auch mit dem 10-fachen Überschuss an Konjugat PSOP hergestellt werden (Abbildung 4.53a-d). In beiden Fällen bewirkte die Enzymzugabe einen Fluoreszenzanstieg, dies konnte jedoch auch für die PSOP beobachtet werden, welche mit 20 Konjugaten beschichtet wurden. Die gewünschte Aggregation wurde durch die geringere Abschirmung tendenziell nicht erreicht. Vielmehr wurde bereits ein Größenanstieg während der Inkubation in Enzympuffer beobachtet, was als kritisch zu betrachten ist, da dies auf eine ungenügende Stabilität der Partikel bereits vor der Enzymzugabe hindeutet. Dies könnte wiederum bedeuten, dass die Oberfläche der Partikel nicht vollständig bedeckt war und somit ein Teil der stark negativ geladenen Citrathülle frei lag. Das kann zum einen eine ungewollte und ungesteuerte Aggregation der Partikel *in vivo* hervorrufen oder bewirken, dass die Partikel unspezifisch binden. Beim Konjugat MMP(LysArgGly)-PEG5000 (K6) ließen sich neben einem Verhältnis von 20 Konjugaten pro VSOP nur mit 5 Konjugaten pro VSOP stabile PSOP herstellen. Bei einem Verhältnis von 10 MMP(LysArgGly)-PEG5000 aggregierten die Partikel wiederholt bereits während der Synthese. Wurden die VSOP elektrostatisch mit 10 Konjugaten beschichtet, bildeten sich bereits Zusammenlagerungen (Abbildung 4.41d), welche auf die basischen Argininseitenketten zurückgeführt wurden. Die Beschichtung mit 10 Konjugaten scheint sowohl kovalent als auch elektrostatisch so ungeeignet, da sich anscheinend stets eine gemischt geladene Oberfläche bildet, die die Aggregation begünstigt. Darüber hinaus hatte auch eine weitere Verringerung der Konjugatmenge pro VSOP (5 Konjugate / VSOP) nicht den gewünschten Effekt (Abbildung 4.53f). Zu beobachten war auch hier eine starke Streuung der Größenmessung bereits vor der Enzymzugabe, welche stärker wurde nachdem das Enzym anwesend war. Die Anwesenheit unreaktiver Arginine (Erhalt positiver Ladungen) sowie die längere Glycinkette (größerer Abstand zwischen Schnittstelle und Partikel, höhere Beweglichkeit) beim

Konjugat MMP(LysArgGly)-PEG5000 (K6) hatten in diesem Fall jedoch scheinbar keinen Einfluss auf eine schnellere Aggregation.

5. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

5.1. AnxA5-beschichtete VSOP

Ziel dieses Teilprojektes war es, AnnexinA5-beschichtete VSOP herzustellen. Dabei sollte eine besonders hohe Abdeckung der Partikeloberfläche durch AnxA5 erreicht werden, um so unspezifische Bindungen oder Wechselwirkungen zu minimieren. Es wurden mit der elektrostatischen und der kovalenten Anbindung von AnxA5 zwei Synthesewege verglichen.

Die elektrostatische Beschichtung der negativ geladenen VSOP mit AnxA5 erfolgte über einen polykationischen Peptidanker. Um eine möglichst hohe Bedeckung der VSOP zu erreichen, wurde das Peptid über die Kopplungsreagenzien SPDP bzw. Sulfo-SMCC mit zwei AnxA5-Molekülen zur Reaktion gebracht. Neben der Abdeckung der geladenen VSOP-Oberfläche sollten die AnxA5-Moleküle ferner auch die polykationische Peptidsequenz abschirmen und so unspezifische Wechselwirkungen verhindern. Die gewünschten AnxA5-Peptid-AnxA5-Konjugate konnten synthetisiert werden, die Ausbeuten waren jedoch gering. Das mit dem Sulfo-SMCC hergestellte Konjugat AnxA5-K1.3a-AnxA5 (K1.4a) wurde schließlich zur Beschichtung von VSOP genutzt und es bildeten sich durch Zugabe der VSOP-Suspension zu der Konjugatlösung AnxA5-Peptid-VSOP. Die elektrostatische Beschichtung erzielte letztlich zwar AnxA5-beschichtete VSOP, aufgrund der schlechten Ausbeuten und hohen Verluste, wurde der Syntheseweg jedoch nicht weiter verfolgt. Prinzipiell stellt die Anbindung eines Proteins über einen polykationischen Peptidanker trotzdem eine interessante Methode zur

Funktionalisierung von Partikeln dar. Grundsätzlich ließen sich auch andere zielgerichtete Moleküle (z. B. Antikörper) mit einem Peptid zur Anbindung an die VSOP modifizieren. Das System erhält dadurch eine hohe Modularität und es wäre auch denkbar, gleichzeitig mehrere Wirkstoffe oder zielgerichtete Moleküle auf der Oberfläche zu binden. Aufgrund der geringen Ausbeuten, konnten jedoch keine Aussagen über die Stabilität der elektrostatischen Bindung und somit über die Stabilität der Partikel unter physiologischen Bedingungen getroffen werden.

Durch die kovalente Bindung von AnxA5 an der aktivierten Citrathülle konnte erfolgreich eine vereinfachte Synthese von AnxA5-beschichteten VSOP etabliert werden. Nach Aktivierung der Citrathülle mit EDC und Sulfo-NHS, erfolgte die Bindung des Proteins über die Aminogruppen der Lysine. Die Bindung erfolgte dabei vermutlich nicht nur über eine der 22 Lysinseitenketten, sondern im besten Fall über mehrere. Dies sollte eine höhere Stabilität der Bindung und einen geringeren Verlust des Proteins *in vivo* zur Folge haben. Darüber hinaus sollte eine ungewollte Immunantwort minimiert werden, da die hergestellten Partikel lediglich aus körperverswandten bzw. körpereigenen Bestandteilen zusammengesetzt sind. Ein weiterer Vorteil ist die hohe Ausbeute. Die aktivierten VSOP wurden über Zentrifugenfilter gereinigt, wobei lediglich Spuren der Partikel an der Membran zurückblieben, und der Überschuss des kostenintensiven AnxA5 konnte wiedergewonnen werden. Die Untersuchung mittels dynamischer Lichtstreuung und Relaxivitätsmessungen deutet darauf hin, dass die Beschichtung der VSOP unter physiologischen Bedingungen stabil ist und somit eine *in-vivo*-Anwendung ermöglicht. Die Charakterisierung der AnxA5-VSOP mittels SDS-PAGE und der Konzentrationsmessungen ergab ferner, dass die VSOP-Oberfläche vermutlich nahezu vollständig mit AnxA5-Molekülen bedeckt ist und somit die stark geladene Citrathülle abgeschirmt ist. Die *in-vitro*-Daten belegten dies durch die spezifische Bindung der AnxA5-VSOP an apoptotische Zellen, während die M1234-VSOP nur sehr geringe unspezifische Wechselwirkungen eingingen. Die Inkubation apoptotischer Zellen mit AnxA5-VSOP führte demnach zu dem gewünschten Signalverlust in der T2*-gewichteten MRT-Messung. Obwohl die Reaktion der VSOP mit AnxA5 nicht chemoselektiv verlief und folglich kein Einfluss auf den Erhalt der Bindungseigenschaften und die Ausrichtung des Proteins auf der Partikeloberfläche genommen werden konnte, blieb die Aktivität des AnxA5 erhalten. Die vorläufigen *in-vivo*-Untersuchungen in einem Ischämie-Reperfusion-Modell deuten ebenfalls auf eine Anwendbarkeit hin, müssen jedoch in weiterführenden Arbeiten bestätigt werden. Infolge der AnxA5-VSOP-Anreicherung trat in dem apoptotischen Gewebe, dem geschädigten Myokard, eine Signalverminderung auf.

Die direkte Anbindung von AnxA5 sollte sich, ähnlich wie die elektrostatische Anbindung, einfach auf andere Wirkstoffe oder zielgerichtete Moleküle (Antikörper, DNA) übertragen lassen, obgleich sie unter Umständen stärker angepasst werden muss. Insbesondere größere Proteine lassen sich unter Umständen schlechter über Zentrifugenfilter von den Partikeln ab-

trennen, als es mit AnxA5 der Fall ist. Ferner muss untersucht werden, ob bei einer Übertragung des Systems auf einen anderen Wirkstoff dieser nach Anbindung seine Funktion nicht verliert. Die Anwendbarkeit von Annexin A5 selber für die Apoptose-Bildgebung konnte bereits in vielen Studien und für nahezu jedes Bildgebungsverfahren belegt werden [20, 65, 67, 69, 71, 98, 179]. Ein Großteil der AnnexinA5-Sonden wird über Markierung mit ^{99m}Tc oder ^{111}In für SPECT-Messungen eingesetzt und befindet sich bereits in klinischer Testung [18, 63, 64, 66]. AnxA5-VSOP stellen jedoch die kleinsten Apoptosesonden für die MRT dar und weisen dadurch unter Umständen eine wesentlich bessere Bioverfügbarkeit als bisherige Nanopartikelsonden auf. Aufgrund der kürzeren Halbwertszeit erlauben sie vermutlich eine schnellere Bildgebung als andere auf Eisenoxidpartikeln basierenden Apoptosesonden [65, 67, 69, 71, 180]. Dies ist insbesondere hinsichtlich der Verwendung in der Klinik von Interesse, da beim Menschen wesentlich längere Bluthalbwertszeiten auftreten würden und sich somit die Zeitspanne zwischen Kontrastmittelgabe und Durchführung der Bildgebung noch verlängern würde. Die hier hergestellten AnxA5-VSOP stellen somit möglicherweise ein vielversprechendes MRT-Kontrastmittel für die molekulare Apoptose-Bildgebung dar.

5.2. PSOP

Die Funktion der protease-spezifischen Eisenoxidpartikel (PSOP) basierte auf der enzymatischen Aktivierung durch MMP-9. Die ursprünglich elektrostatisch stabilisierten VSOP wurden mit Peptid-PEG-Konjugaten beschichtet, welche den Partikeln aufgrund der PEG-Hülle eine sterische Stabilisierung verliehen. Das PEGylierte Peptid wies lokal einen stark polykationischen Charakter auf und verfügte zudem über eine Schnittstelle für das Enzym MMP-9. Infolge der enzymatischen Aktivierung wurden die Peptid-PEG-Reste abgespalten und die PSOP verloren ihre sterische Stabilisierung. Zudem wurde eine gemischt geladene Oberfläche freigelegt und die Partikel aggregierten (Abbildung 4.27).

Ziel dieses Teilprojektes war es, PSOP mit hoher Stabilität unter physiologischen Salzbedingungen und unter Erhalt der enzymatischen Aktivierbarkeit herzustellen. Die Beschichtung der VSOP erfolgte entweder elektrostatisch mit argininreichen Peptid-PEG-Konjugaten oder kovalent mit lysinreichen Peptid-PEG-Konjugaten. Insgesamt wurden fünf verschiedene Konjugate hergestellt und die daraus hergestellten PSOP miteinander verglichen (Tabelle 5.1). Der Zweck der kovalenten Bindung an die Citrathülle bestand darin, die Bindung der Konjugate an der Oberfläche zu verstärken, um so die Stabilität unter physiologischen Bedingungen zu erhöhen. Die Konjugate unterschieden sich neben der Arginin- bzw. Lysinsequenz ferner in der Anzahl der Kopplungsstellen für PEG, mit dem Zweck die sterische Stabilisierung durch eine dichtere PEG-Hülle zu verbessern.

Tabelle 5.1: Übersicht der hergestellten Peptid-PEG-Konjugate.

Bezeichnung des Peptid-PEG-Konjugats	Zweck der Variation ausgehend von K2
MMP(Arg)-PEG5000 (K2)	-
MMP(Arg)-(PEG5000) ₂ (K3)	Verbesserung der sterischen Stabilisierung und der <i>stealth</i> -Eigenschaften
(MMP(Arg)-(PEG5000) ₂)-Cys-Dimer (K4)	stärkere Bindung des Konjugats an Citrathülle durch kumulative Bindung Verbesserung der sterischen Stabilisierung und der <i>stealth</i> -Eigenschaften
MMP(Lys)-PEG5000 (K5)	stärkere Bindung des Konjugats an Citrathülle durch kovalente Bindung
MMP(LysArgGly)-PEG5000 (K6)	stärkere Bindung des Konjugats an Citrathülle durch kovalente Bindung Erhalt positiver Ladungen nach kovalenter Anbindung des Konjugats

Die Stabilität der erhaltenen PSOP in verschiedenen Salzlösungen und die enzymatische Aktivierbarkeit wurden mittels Größen- und Fluoreszenzmessungen analysiert. Es kann dabei folgendes zusammengefasst werden:

- Die elektrostatische Beschichtung der VSOP mit den Konjugat-Monomeren (K2, K3, K5, K6) erzielte PSOP, welche *in vitro* enzymatisch aktivierbar waren.
- Im Vergleich zu den mit den Konjugat-Monomeren (K2, K3, K5, K6) elektrostatisch beschichteten PSOP, konnte durch den kumulativen Effekt des Konjugat-Dimers (K4) und durch kovalente Kopplung der Konjugat-Monomere (K5, K6) eine hohe Salzstabilität erreicht werden.
- Die Aktivierbarkeit war bei allen PSOP mit hoher Salzstabilität zumindest stark eingeschränkt. Diese ließ sich auch nach Ausschluss der Fehlerquellen (Nebenreaktion des Konjugats mit EDC und Sulfo-NHS; Enzymhemmung durch Sulfo-NHS) oder durch Variation der Beschichtungsverhältnisse nicht wiederherstellen.
- Die plausibelste Erklärung dafür ist, dass das Enzym MMP-9 durch die Partikelnähe der Schnittstellen gehemmt wurde. Dies könnte u. a. durch sterische Hemmung (trotz Verlängerung der Glycinsequenz) oder Partikeloberflächen-Effekte verursacht worden sein.
- Unter dieser Annahme, wurden bei den elektrostatisch beschichteten PSOP eventuell lediglich frei gelöste Konjugate gespalten, die sich mit den auf der Partikeloberfläche gebundenen Konjugaten austauschen, wodurch die PSOP *in vitro* letztlich aktiviert werden konnten.

Durch die Variation der Synthesen, der verschiedenen Verhältnisse an Konjugat sowie den Einsatz verschiedener Konjugate konnte gezeigt werden, dass die enzymatische Aktivierung der PSOP ein komplexer Prozess ist. Es ließen sich entweder Partikel mit einer stabilen Beschichtung oder enzymatisch aktivierbare Partikel herstellen. Man kommt folglich zu dem Ergebnis, dass sich auf Basis der VSOP mit den untersuchten Konjugaten keine protease-spezifischen Sonden für die MRT-Bildgebung herstellen ließen, weil nicht gewährleistet werden konnte, dass die Partikel im Zielgewebe enzymatisch aktiviert werden oder dass bei unzureichend fester Bindung der Konjugate auf der Partikeloberfläche überhaupt das Zielgewebe erreicht wird. Eine mögliche Alternative zu den VSOP wären in dem Fall Partikel mit einer beweglicheren Hülle (z. B. Dextran), die es erlaubt, dass auch fest gebundene Peptid-PEG-Konjugate enzymatisch gespalten werden.

6. EXPERIMENTELLER TEIL

6.1. Chemikalien

Für alle wässrigen Lösungen wurde Wasser der Reinheitsstufe *Milli-Q-Pore* verwendet. Die Wasseraufbereitung erfolgte mit einer Reinstwasseranlage der Firma *Millipore* (Eschborn, Deutschland). Das Kopplungsreagenz *N*-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionat (SPDP) wurde bei der Firma *Molecular Biosciences* (Boulder, USA) und das Kopplungsreagenz Sulfosuccinimidyl-4-(*N*-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat Natriumsalz (Sulfo-SMCC) wurde bei der Firma *Calbiochem* (Darmstadt, Deutschland) erworben. Die Polyethylenglykole α -Methoxy- ω -Succinimidyl-PEG5000 (NHS-PEG5000) und α -Methoxy- ω -Maleimid-PEG5000 (Mal-PEG5000) wurden von der Firma *Rapp Polymere GmbH* (Tübingen, Deutschland) bezogen. Die für die durchflussszytometrischen Messungen verwendeten Lösungen FACS Clean™, FACS Flow™ und FACS Rinse™ stammten von der Firma *Becton Dickinson* (Heidelberg, Deutschland). Der Bicinchoninsäure-Proteinnachweis (BCA-Proteinnachweis) und Bradford-Proteinnachweis (*Coomassie Plus assay*) wurden von der Firma *Pierce* (Rockford, USA) als *Kit* bezogen. Die Herstellung der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgele (SDS-Polyacrylamidgele) erfolgte mit dem *SDS Gel Preparation Kit* der Firma *Sigma-Aldrich* (Steinheim, Deutschland). Als Proteinmarker wurde der Größenmarker *Precision Plus Protein All Blue Standard* der Firma *Bio-Rad* (München, Deutschland) verwendet. Zum Färben der nativen und SDS-Polyacrylamidgele wurde die Färbelösung *Coomassie Brilliant Blue R-250* der Firma *Bio-Rad* (München, Deutschland) genutzt. Die Chemikalien α -Cyano-4-Hydroxy-

zimsäure (CHCA), Dimethylsulfoxid (DMSO), Dithiothreitol (DTT), 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimidhydrochlorid (EDC), Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Fluoresceinisothiocyanat (FITC), 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure (HEPES), 2-(*N*-Morpholino)ethansulfonsäure (MES), *N*-Hydroxysulfosuccinimid Natriumsalz (Sulfo-NHS), Trifluoressigsäure (TFA), Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) sowie alle weiteren Chemikalien wurden von der Firma *Sigma-Aldrich* (Steinheim, Deutschland) bezogen. Alle eingesetzten Peptide sowie ihre Verwendung und den Hersteller können Tabelle 6.1 entnommen werden. Die Peptide wurden als TFA-Salze geliefert und trugen am C-Terminus eine Amidgruppe. Die Reinheit der Peptide betrug mind. 95 % und wurde mittels HPLC und Massenspektrometrie vom Hersteller überprüft.

Tabelle 6.1: Übersicht der eingesetzten Peptide (P1-P6) und der daraus hergestellten Konjugate (K1-K6). Alle Peptide wiesen am C-Terminus eine Amidgruppe auf und trugen an einer Lysinseitenkette den Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein (Fluo). Die zur PSOP-Herstellung eingesetzten Peptide P2-P6 verfügten außerdem über die Schnittstelle *PRQITA* (kursiv geschriebene Aminosäuren) für die Enzyme MMP-2 und -9.

Peptid	Aminosäuresequenz	Konjugat	Verwendung	Hersteller	Firmensitz
P1	GRRRR RGRRR RRK(Fluo)RR RRRGR RRRRG K	SPDP-P1-SPDP (K1.1) (AnxA5-K1.1-AnxA5, K1.2) SMCC-P1-SMCC (K1.3) (AnxA5-K1.3-AnxA5, K1.4)	AnxA5-Peptid- VSOP	<i>Biosyntan GmbH</i>	Berlin, Deutschland
P2	GGPRQ <i>ITAGK</i> (Fluo) GGGGR RRRRG RRRRR	MMP(Arg)-PEG5000 (K2)	elektrostatisch beschichtete PSOP	<i>Biosyntan GmbH</i>	Berlin, Deutschland
P3	GKGGP <i>RQITA</i> GK(Fluo)GGG GRRRR RGRRR RR	MMP(Arg)-(PEG5000) ₂ (K3)	elektrostatisch beschichtete PSOP	<i>Biosyntan GmbH</i>	Berlin, Deutschland
P4	(GKGGP <i>RQITA</i> GK(Fluo)GGG GRRRR RGRRR RRC)-Dimer	(MMP(Arg)-(PEG5000) ₂)- Cys-Dimer (K4)	elektrostatisch beschichtete PSOP	<i>Biosyntan GmbH</i>	Berlin, Deutschland
P5	KKKKK KKKKK GGGGP <i>RQITA</i> GK(Fluo)GC	MMP(Lys)-PEG5000 (K5)	kovalent beschichtete PSOP	<i>Biosyntan GmbH</i>	Berlin, Deutschland
P6	RKKRK KRKKR KKRGG GGGGP <i>RQITA</i> GK(Fluo)GC	MMP(LysArgGly)- PEG5000 (K6)	kovalent beschichtete PSOP	<i>Pepnome Limited</i>	Shanghai, China

6.2. VSOP

Die verwendeten Eisenoxidnanopartikel *very small iron oxide particles* (VSOP) wurden von Frau Monika Ebert in der Abteilung Experimentelle Radiologie der *Charité - Universitätsmedizin Berlin* (Berlin, Deutschland) hergestellt und charakterisiert [130]. Der Citratgehalt der VSOP wurde dabei mittels HPLC bestimmt. Die VSOP wurden dafür in 6 N Salzsäure gelöst und vor der Injektion im Verhältnis 1:20 mit Wasser verdünnt. Die Charakterisierung der VSOP mittels TEM erfolgte an der *Technischen Universität Berlin* (Berlin, Deutschland) in der Zentraleinrichtung Elektronenmikroskopie durch Herrn Sören Selve. Exemplarische TEM-Aufnahmen sind in Abbildung 6.1 gezeigt. Basierend auf den ermittelten Kerndurchmessern wurde mit Hilfe des Programms *CrystalMaker* Version 8.6 ein Magnetitkristall modelliert und die Anzahl der Eisenatome pro VSOP abgeschätzt [17]. Die Eigenschaften der eingesetzten VSOP sind in Tabelle 6.2 zusammengefasst.

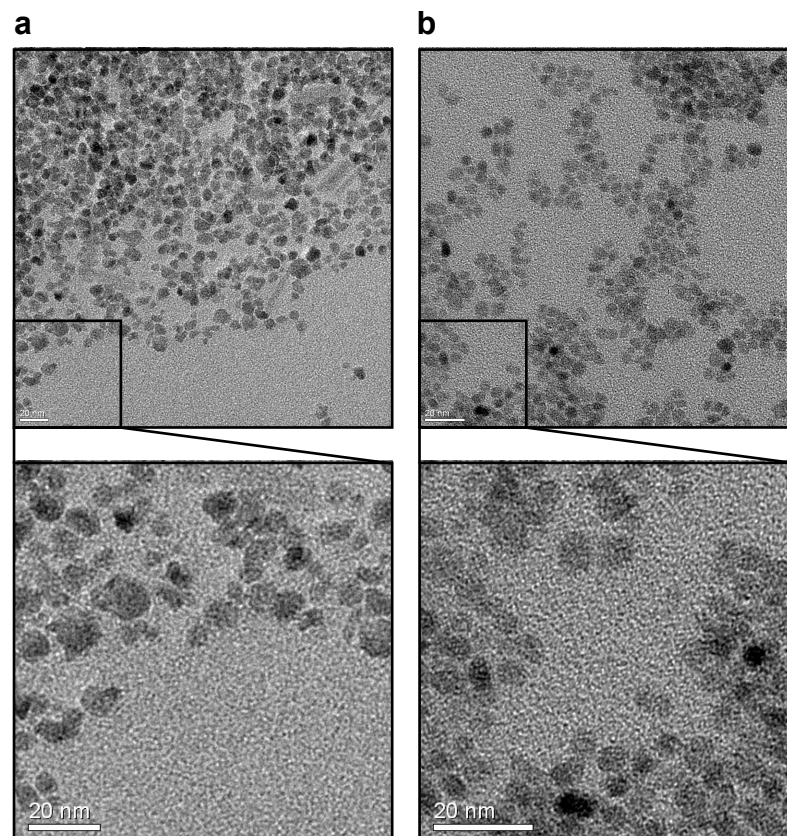


Abbildung 6.1: TEM-Aufnahmen der eingesetzten VSOP. Die VSOP 081209F4 hatten einen Kerndurchmesser von $8,8 \pm 1,4$ nm **(a)** und die VSOP 190411F3 hatten einen Kerndurchmesser von $6,8 \pm 1,4$ nm **(b)** (Größenmarker: 20 nm).

Tabelle 6.2: Eigenschaften der verschiedenen VSOP. Der Citratgehalt pro Eisen wurde mittels HPLC^a und der Kerndurchmesser aus TEM-Daten^b ermittelt. Die Anzahl der Eisenatome pro Partikel wurde basierend auf TEM-Daten mit Hilfe des Programms *CrystalMaker* Version 8.6 abgeschätzt.

^aDurchführung von Frau Monika Ebert (Charité - Universitätsmedizin Berlin).

^bDurchführung von Herrn Sören Selve (Technische Universität Berlin).

VSOP	Fe-Atome	Citrat / Fe [(w/w) %]	Citrat / VSOP	Durchmesser [nm] (TEM)	Verwendung
081209F4	14000	12	500	8,8 ± 1,4	AnxA5-Peptid-VSOP
190411F3	6500	16	300	6,8 ± 1,4	AnxA5-VSOP PSOP

6.3. Biologisches Material

Das eingesetzte Cys-Annexin A5 (AnxA5) und die nicht-bindende Variante Cys-M1234 (M1234) wurden von der Firma *MosaMedix Health Care* (Maastricht, Niederlande) bezogen. Beide Proteine wurden in gelöster Form (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, pH 7,4) geliefert und bei 4 °C aufbewahrt.

Das Enzym MMP-9 wurde von der Firma *Calbiochem* (Darmstadt, Deutschland) erworben. Es wurde als aktive Form geliefert und war in 50 mM HEPES, 10 mM CaCl₂, 20 % Glycerol und 0,005 % BRIJ®-35 Detergenz (pH 7,5) gelöst. Die Aufbewahrung erfolgte bei -80 °C.

Die Jurkat-T-Zellen wurden von der Firma *ATCC* (Wesel, Deutschland) bezogen und bei 37 °C und einem CO₂-Gehalt von 5 % in Kultur gehalten. Als Zellkulturmedium wurde RPMI-1640 mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) sowie 1 % Penicillin / Streptomycin verwendet. RPMI-1640, FCS und Penicillin / Streptomycin wurden von der Firma *Life Technologies* (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

6.4. Geräte und Hilfsmittel

6.4.1. Konzentrierung und Filtration über Zentrifugen-Filtrationseinheiten

Die Konzentrierung und Reinigung über Zentrifugen-Filtrationseinheiten erfolgte mit Filtrationseinheiten der Firma *Millipore* (Eschborn, Deutschland) mit regenerierter Zellulose als Filtermaterial. Die Zentrifugation erfolgte bei 4 °C und 1500 x g. Die Verwendung der Zentrifugfilter und die jeweilige Anwendung können Tabelle 6.3 entnommen werden.

Tabelle 6.3: Verwendete Zentrifugenfilter und die jeweilige Anwendung. Die Zentrifugeneinheiten wiesen als Filter die Membran Ultracel (regenerierte Zellulose) auf.

Zentrifugenfilter	Ausschlussgröße	Fassungsvermögen	Anwendung
Amicon Ultra-4 mit Ultracel-30	30 kDa	4 ml	Abtrennung von überschüssigem Sulfo-NHS und EDC nach Aktivierung von VSOP
Amicon Ultra-4 mit Ultracel-100	100 kDa	4 ml	Reinigung von AnxA5-VSOP Reinigung von PSOP

6.4.2. Größenausschlusschromatographie

Die Durchführung der Größenausschlusschromatographie erfolgte mit dem *BioLogic LP System* und dem *BioLogic Fraction Collector* der Firma *Bio-Rad* (München, Deutschland). Zur Aufnahme der Chromatogramme wurde die dazugehörige Software *LP Data View™* Version 1.03 genutzt. Als Säulen dienten *Econo-Columns* aus Glas von der Firma *Bio-Rad* (München, Deutschland), welche mit den für die Anwendung spezifischen Säulenmaterialien gefüllt wurden. Als Säulenmaterialien dienten verschiedene Sephadex™-Gele der Firma *GE Healthcare* (München, Deutschland) sowie verschiedene Bio-Gele der Firma *Bio-Rad* (München, Deutschland).

Für die Reinigung der aktivierten Peptide **SPDP-P1-SPDP (K1.1)** und **SMCC-P1-SMCC (K1.3)** wurde eine *Econo-Coulmn* (\varnothing 10 mm, l = 200 mm) mit dem Säulenmaterial Sephadex™ G-15 (14 ml) gefüllt und mit einem Fluss von 1 ml/min betrieben. Als Elutionspuffer diente eine HEPES-Puffer (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, pH 7,4). Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280$ nm. Das aufgetragene Probevolumen betrug bis zu 600 μ l und das Volumen der gesammelten Fraktionen betrug 500 μ l.

Die Reinigung des Protein-Peptid-Konjugats **AnxA5-K1.3-AnxA5 (K1.4)** erfolgte über eine *Econo-Column* ($\varnothing = 15$ mm, l = 200 mm) gefüllt mit Sephadex™ G-100 (25 ml). Die Flussrate betrug 0,75 ml/min und als Elutionspuffer wurde ein HEPES-Puffer (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, pH 7,4) genutzt. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280$ nm. Es wurde ein Probevolumen von 1000 μ l aufgetragen, die gesammelten Fraktionen hatten ein Volumen von 375 μ l.

Die Reinigung der **Peptid-PEG-Konjugate** wurde durchgeführt mit *Econo-Columns* ($\varnothing = 10\text{-}15\text{ mm}$, $l = 200\text{-}300\text{ mm}$), welche mit Bio-Gel P6, P10 oder P30 gefüllt wurden. Als Elutionspuffer diente ein HEPES-Puffer (10 mM HEPES, pH 7,4) und die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280\text{ nm}$. Die Flussrate, das aufgetragene Probevolumen, die Größe der gesammelten Fraktionen sowie das genutzte Bio-Gel der jeweiligen Anwendung sind in Tabelle 6.4 zusammengefasst.

Tabelle 6.4: Übersicht der verwendeten Parameter für die Reinigung der verschiedenen Peptid-PEG-Konjugate über Größenausschlusschromatographie.

Konjugat	Säulengröße	Säulenmaterial	Flussrate [ml/min]	Probevolumen [μl]	Fraktionsgröße [μl]
MMP(Arg)-PEG5000 (K2)	$\varnothing = 10\text{ mm}$ $l = 200\text{ mm}$	P10 (13 ml)	0,35	400	350
MMP(Arg)-(PEG5000) ₂ (K3)	$\varnothing = 10\text{ mm}$ $l = 200\text{ mm}$	P10 (13 ml)	0,35	450	350
(MMP(Arg)-(PEG5000) ₂)-Cys-Dimer (K4)	$\varnothing = 10\text{ mm}$ $l = 300\text{ mm}$	P30 (25 ml)	0,5	500	500
MMP(Lys)-PEG5000 (K5)	$\varnothing = 10\text{ mm}$ $l = 300\text{ mm}$	P10 (25 ml)	0,3	350	300
MMP(LysArgGly)-PEG5000 (K6)	$\varnothing = 15\text{ mm}$ $l = 300\text{ mm}$	P6 (36 ml)	0,5	380	500

6.4.3. HPLC

Für die HPLC wurde ein Gerät der Serie *Ultimate3000* der Firma *Thermo Scientific Dionex* (Idstein, Deutschland), bestehend aus Pumpe, Autosampler, Säulenofen und Diodenarraydetektor, benutzt. Die verwendete Software war *Chromeleon* Version 6.80. Die Detektion erfolgte standardmäßig bei einer Wellenlänge von $\lambda = 210\text{ nm}$. Bei den Proben, die Fluorescein enthielten, erfolgte die Detektion zusätzlich bei einer Wellenlänge von $\lambda = 440\text{ nm}$. Als Trennsäule (*Thermo Scientific Dionex*, Idstein, Deutschland) diente eine auf $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperierte *Acclaim 300* RP-C18 $3\text{ }\mu\text{m}$ $4,6 \times 150\text{ mm}$ (Porengröße 300 \AA). Als Vorsäule (*Thermo Scientific Dionex*, Idstein, Deutschland) diente eine ebenfalls auf $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperierte *Acclaim 300* RP-C18 $3\text{ }\mu\text{m}$ $4,3 \times 10\text{ mm}$ (Porengröße 300 \AA). Die Flussrate betrug 1 ml/min . Als mobile Phase wurde ein binäres Gemisch aus A (99,95 % H_2O , 0,05 % TFA) und B (99,95 % CH_3CN , 0,05 % TFA) verwendet.

Verwendeter Gradient: 0-20 min 10 % B \rightarrow 100 % B

6.4.4. MALDI/TOF-Massenspektrometrie

Die Messungen der MALDI/TOF-Massenspektren erfolgte auf einer *Voyager™ Biospectrometry™ Workstation* mit *Delay Extraction™ Technology* der Firma *PerSeptive Biosystems* (Wiesbaden, Deutschland) in den Laboren der AG Volkmer (Institut für Medizinische Immunologie, *Charité - Universitätsmedizin Berlin*). Die Ionisierung erfolgte mit einem Stickstoff-UV-Laser bei einer Wellenlänge von $\lambda = 337$ nm (Beschleunigungsspannung 24.000 V). Als Matrix wurde eine gesättigte Lösung von 10 mg CHCA in 1 ml H₂O/CH₃CN/TFA (500:500:0,5) eingesetzt.

6.4.5. PAGE

Die Durchführung der PAGE erfolgte mit der *Mini PROTEAN 3 Cell* und dem *PowerPac Basic Power Supply* von *Bio-Rad* (München, Deutschland). Die Dokumentation der Gele erfolgte mit der *Syngene G:Box* von *VWR* (Darmstadt, Deutschland). Für die Aufnahme der Bilder wurde die Software *Gene Snap* Version 7.09 genutzt und für die Auswertung der Bilder die Software *Gene Tools* Version 4.02.

Die Herstellung der SDS-Polyacrylamidgele erfolgte entsprechend der Anleitung des verwendeten *SDS Gel Preparation Kit*. Die Zusammensetzung der Trenngele sowie des Sammelgels können Tabelle 6.5 und Tabelle 6.6 entnommen werden. Die nativen Polyacrylamidgele mit einem Polyacrylamid-Anteil von 10 % wurden gemäß der in Tabelle 6.7 aufgeführten Zusammensetzung hergestellt. Vor Zugabe der frisch hergestellten Ammoniumpersulfat-Lösung (APS) wurden die weiteren Lösungen gut durchmischt. Danach wurden die Lösungen erneut gut durchmischt, sofort in die Gelkammer pipettiert und das Gel über mind. 60 min polymerisiert. Alle Gele wurden mit einer Dicke von 0,75 mm und mit 10 Taschen gegossen. Pro Tasche wurde, wenn nicht anders vermerkt, ein Proteingehalt von 0,5-1,0 µg in einem Probevolumen von 20 µl aufgetragen.

Tabelle 6.5: Pipettierschema für 15 ml SDS-Trenngel. Die Volumenangaben sind in ml.

TEMED: *N,N,N',N'*-Tetramethylethyldiamin; APS: Ammoniumpersulfat.

	12,5%iges Trenngel	15%iges Trenngel
Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung	6,25	7,5
Trenngel-Puffer	5	5
H ₂ O	3,5	2,25
TEMED (10 % w/v)	0,25	0,25
APS (10 % w/v)	0,1	0,1

Tabelle 6.6: Pipettierschema für 5 ml SDS-Sammelgel. Die Volumenangaben sind in ml. TEMED: N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin; APS: Ammoniumpersulfat.

8%iges Sammelgel	
Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung	1
Trenngel-Puffer	1
H ₂ O	2,9
TEMED (10 % w/v)	0,1
APS (10 % w/v)	0,03

Tabelle 6.7: Pipettierschema für 15 ml natives Polyacrylamidgel [181]. Die Volumenangaben sind in ml. TEMED: N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin; APS: Ammoniumpersulfat.

10%iges Trenngel	
Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung	4,95
TRIS-Cl (1,5 M, pH 8,8)	3,75
H ₂ O	6,3
TEMED (10 % w/v)	0,2
APS (10 % w/v)	0,065

6.4.5.1. SDS-PAGE

Für die Untersuchung der **Peptid-PEG-Konjugate** wurden SDS-Polyacrylamidgele verwendet. Das Sammelgel hatte einen Polyacrylamid-Anteil von 8 % und das Trenngel von 15 %. Die Proben wurden zunächst 1:1 mit SDS-Probenpuffer (62,5 mM TRIS-HCl, 2,5 % (v/v) Glycerol, 2 % (w/v) SDS, pH 6,8) gemischt und dann über 5 min bei 95 °C denaturiert. Nach Einsetzen des Gels in die Gelkammer, wurde diese mit SDS-Laufpuffer (25 mM TRIS, 190 mM Glycin, 3,5 mM SDS, pH 8,3) gefüllt und die Proben wurden in die Probentaschen aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 200 V durchgeführt und wurde beendet, sobald die erste Bande des Größenmarkers das Ende des Gels erreicht hatte. Im Anschluss wurde ein Foto mit der UV-Kamera der Geldokumentationskammer von den fluoreszierenden Banden gemacht. Zur Färbung der Banden wurde das Gel über 1 h in einer Coomassie-Lösung inkubiert. Für die Entfärbung des Hintergrunds wurde das Gel dreimal über 15 min in Entfärbe-Lösung (50 % (v/v) Methanol, 7 % (v/v) CH₃COOH) inkubiert.

Die Untersuchung der **AnxA5-Peptid-AnxA5-Konjugate** erfolgte mit einem 8%igem Sammel- und einem 12,5%igem Trenngel. Der hier verwendete Probenpuffer enthielt zusätzlich zu den oben angegebenen Chemikalien Bromphenolblau (0,01 % (w/v)). Die weitere Durchführung war analog zu der Untersuchung der Peptid-PEG-Konjugate.

6.4.5.2. Native PAGE

Für die Untersuchung der **AnxA5-VSOP** wurden 10%ige native Polyacrylamidgele genutzt. Die Proben wurden im Verhältnis 1:1 mit nativem Probenpuffer (62,5 mM TRIS-HCl, 3 % (v/v) Glycerol, 0,01 % (w/v) Bromphenolblau, pH 6,8) gemischt. Nach Einsetzen des Gels in die Kammer und Füllen der Kammer mit nativem Laufpuffer (25 mM TRIS, 190 mM Glycin, pH 8,3), wurden die Taschen mit den Proben beladen. Die angelegte Spannung betrug 120 V. Die weitere Durchführung war analog zu der Durchführung der SDS-PAGE.

6.4.6. UV/Vis-Spektroskopie

Die Aufnahme von **Absorptionsspektren** sowie die Konzentrationsbestimmung der **Fluorescein-markierten Peptide** erfolgte am *Specord 205* der Firma *Analytik Jena* (Jena, Deutschland) und die dabei genutzte Software war *WinASPECT* Version 2.1.1.0. Die Messungen der Probelösungen wurden in einer Mikroküvette (104-QS, 10 mm) der Firma *Hellma Analytics* (Müllheim, Deutschland) durchgeführt. Als Blindwert diente der jeweilige Puffer in dem die zu untersuchende Substanz gelöst war.

Die Konzentrationsbestimmung **Fluorescein-markierter Peptide (P1-P6)** und der daraus hergestellten Konjugate erfolgte über die Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von $\lambda = 494 \text{ nm}$. Mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes konnte die Konzentration c bei bekanntem molarem Extinktionskoeffizienten ϵ ($\epsilon_{494, \text{Fluorescein}} = 72.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) unter Berücksichtigung der Schichtdicke d nach Messung der Absorption A berechnet werden [182]:

$$A = \epsilon \cdot c \cdot d$$

Zur Konzentrationsbestimmung von **Protein- und Eisenlösungen** wurde das Mikrotiterplatten-Spektralphotometer *PowerWave XS2* der Firma *BioTek* (Bad Friedrichshall, Deutschland) genutzt. Als Software diente *Gen5* Version 1.07.5. Die Messungen wurden in 96-well-Platten der Firma Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland) aus Polystyrol durchgeführt.

Zur **Proteinbestimmung** wurde der BCA-Proteinnachweis von *Pierce* verwendet. Der kolorimetrische Nachweis beruht auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} durch Proteine in alkalischem Milieu. Das einwertige Kupfer wird von der Bicinchoninsäure (*bicinchoninic acid*,

BCA) komplexiert und es bildet sich ein violetter Farbstoff mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm [183]. Mit Hilfe einer Rinderalbumin-Stammlösung (BSA-Stammlösung) (2 g/l) wurde eine BSA-Standardreihe (50-800 µg/ml) und aus den BCA-Reagenzien wurde eine Arbeitslösung hergestellt. Von der Arbeitslösung wurden 200 µl pro *well* aufgetragen und mit jeweils 20 µl der BSA-Standards bzw. der Probelösung versetzt. Im Falle der AnxA5-VSOP wurde VSOP-Suspension als Leerwert eingesetzt. Nach 30 min Inkubation bei 60 °C, wurden die Proben auf RT abgekühlt und bei einer Wellenlänge von $\lambda = 562$ nm gemessen. Die Messung wurde als Doppelbestimmung durchgeführt.

Die **Eisenbestimmung** der VSOP erfolgte mit einem Aufschluss durch HCl und der Oxidation von Fe^{2+} zu Fe^{3+} durch Wasserstoffperoxid, wodurch ein Farbumschlag von farblos zu gelb stattfindet [184, 185]. Mit Hilfe der Eisen-Stammlösung (20 g/l) wurde eine Eisen-Standardreihe (0,5-6 g/l) hergestellt. Als Reagenz diente eine Lösung aus 6 N HCl und 30%iger H_2O_2 -Lösung, welche im Verhältnis 1000:1 gemischt wurden. Zu 200 µl HCl/ H_2O_2 -Reagenz wurden dann 2 µl Probe- bzw. Standardlösung hinzugegeben. Nach 30 min Inkubation bei RT wurden die Lösungen in die *wells* pipettiert und bei einer Wellenlänge von $\lambda = 410$ nm gemessen [186]. Die Messung wurde als Doppelbestimmung durchgeführt.

6.4.7. Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzmessungen wurden an dem Gerät *Fluorescence Spectrophotometer F-7000* der Firma *Hitachi* (Tokyo, Japan) mit der dazugehörigen Software *FL solutions* Version 2.1 durchgeführt. Die Messungen erfolgten in einer Halbmikroküvette (104F-QS, 4 x 10 mm) der Firma *Hellma Analytics* (Müllheim, Deutschland).

Anregungswellenlänge:	$\text{Ex} = 494$ nm
Emissionswellenlänge:	$\text{Em} = 521$ nm
Schlitzbreiten:	$\text{Slit}_{\text{Ex}} = 2,5$ nm
	$\text{Slit}_{\text{Em}} = 2,5$ nm
PMT Voltage:	700 V

6.4.8. Dynamische Lichtstreuung

Die Größenbestimmung der Eisenoxidnanopartikel erfolgte über dynamische Lichtstreuung mit dem Gerät *Zetasizer Nano ZS* der Firma *Malvern Instruments* (Herrenberg, Deutschland). Die verwendete Software war *Zetasizer* Version 6.20. Die Messungen wurden mit einer Ultramikroküvette (105.251.005-QS, 3 x 3 mm) der Firma *Hellma Analytics* (Müllheim, Deutschland) durchgeführt und erfolgten bei einer Temperatur von 23 °C sowie einem Messwinkel von 173 ° (Rückstreuung). Die Nanopartikel wurden sofern nicht anders ange-

geben mit einer Eisenkonzentration von 1 mM und in einem HEPES-Puffer (10 mM HEPES, pH 7,4) gemessen. Die Darstellung der AnxA5-beschichteten VSOP erfolgte anzahlgewichtet und die der PSOP erfolgte volumengewichtet.

6.4.9. Durchflusszytometrie

Die Bestimmung der Anzahl apoptotischer Jurkat-T-Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie am Gerät *FACSCalibur* der Firma *Becton Dickinson* (Heidelberg, Deutschland). Die genutzte Software war *CellQuest* Version 3.3. Als Apoptosemarker diente Fluorescein-markiertes Annexin A5 (AnnexinA5-FITC, eigene Herstellung). Als Negativkontrollen wurden alle zu untersuchenden Proben als ungefärbte Zellen gemessen. Die Auswertung erfolgte mit der Software *FlowJo* Version 8.7.

6.4.10. Relaxivitätsmessungen

Die Untersuchung der Relaxivitäten erfolgte an dem Gerät *the minispec nq40 NMR analyzer* (40 MHz, 0,94 T) der Firma *Bruker BioSpin* (Karlsruhe, Deutschland). Die genutzte Software war *the minispec* Version 2.51. Die Messung erfolgte bei einer konstanten Temperatur von 37 °C. Das Probenvolumen betrug 300 µl und als Proberöhrchen dienten NMR-Proberöhrchen (5 mm x 203 mm, dünnwandig) der Firma *VWR*. Vor der Messung wurden die Proben im Wasserbad auf 40 °C temperiert.

6.4.11. Magnetresonanztomographie

Die magnetresonanztomographischen Untersuchungen der **Zellphantome** wurden an einem *1,5-T-Magnetom* der Firma *Siemens* (Erlangen, Deutschland) mit einer Handspule durchgeführt. T2*-gewichtete Bilder wurden mit einer Gradientenechosequenz (Echozeit (TE) = 10.7 ms, Repetitionszeit (TR) = 200 ms, Flipwinkel (FA) = 40 °) aufgenommen und die Auswertung erfolgte mit der Software *Osirix* Version 3.9.2. Die Berechnung der T2*-Relaxationszeiten basierte auf Messungen mit einer Multiechosequenz (TE = 3.1 - 44.8 ms, TR = 100 ms, FA = 40 °) und die Auswertung erfolgte mit der Software *ImageJ* Version 1.46r.

Die Bestimmung der **Signalintensitätshalbwertszeiten von AnxA5-VSOP** erfolgte an einem *1,5-T-Magnetom* der Firma *Siemens* (Erlangen, Deutschland) mit einer Solenoid-Körperspule für Mäuse. Als Sequenz diente eine T1-gewichtete Gradientenechosequenz (TE = 2,3 ms, TR = 6.6 ms, FA = 25 °, Schichtdicke = 0.5 mm). Die Auswertung erfolgte mit der Software *OsiriX* Version 3.9.2, der Software *ImageJ* Version 1.46r und der Software *Prism* Version

5.0a. Die Durchführung und Auswertung erfolgte durch Franziska Appler (AG Schellenberger, Experimentelle Radiologie, *Charité - Universitätsmedizin Berlin*).

Die Untersuchung der **spezifischen Anreicherung der AnxA5-VSOP** in einem Mausmodell mit Ischämie-Reperfusionsschädigung des Herzens wurden am *Martinos Center for Biomedical Imaging (Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School)* in Boston, Massachusetts, von Howard Chen (AG David Sosnovik) durchgeführt und ausgewertet. Die Messung erfolgte an einem 9,4-T-Kleintierscanner der Firma *Bruker* (Billerica MA, USA) mit einer T2-gewichteten Gradientenechosequenz (TE = 1; 4; 5 ms, TR = RR interval/20, FA = 30 °, *field of view* = 25 x 25 mm, Matrix = 200 x 200). Aufgrund technischer Probleme am 9,4-T-Kleintierscanner erfolgte die Messung der Kontrollsonde M1234-VSOP *ex vivo* an einem 4,7-T-Kleintierscanner der Firma *Bruker* (Billerica MA, USA) mit einer Multiechosequenz (TE = 4 - 35,5 ms, TR = 1500 ms, FA = 30 °, *field of view* = 25,6 x 25,6 mm, Matrix = 256 x 256, Schichtdicke = 1 mm). Aus den erhaltenen Bildern der Multiechosequenz (acht Echozeiten) wurden die T2*-Relaxationszeiten ermittelt und farbkodiert dargestellt.

6.5. Synthese und Charakterisierung von AnxA5-beschichteten VSOP

AnxA5 wurde vor Umsetzungen über die Thiolgruppe immer mit DTT behandelt, um mögliche Disulfidbrücken zu spalten. Die AnxA5-Lösung wurde dafür in einem Reaktionsgefäß vorgelegt und es wurde soviel einer 1 M DTT-Lösung zugegeben, bis eine 10 mM DTT-Lösung entsteht. Es schloss sich dann eine Inkubation bei 37 °C über 90 min an. Am Ende der Inkubationszeit erfolgte die Zugabe einer 1 M EDTA-Lösung (finale EDTA-Konzentration: 10 mM). Die anschließende Dialyse zur Abtrennung von DTT erfolgte in einem Dialyseschlauch *Spectra/Por® 7 (Roth, Karlsruhe, Deutschland)* aus regenerierter Zellulose mit einer molekularen Ausschlussgröße von 15.000 Da. Es wurde dreimal über mindestens 8 h gegen einen HEPES-Puffer (25 mM HEPES, 140 mM NaCl, 10 mM EDTA, pH 7,4) dialysiert, wobei das Volumen des Dialysepuffers dem 1.000-fachen des Reaktionsansatzes entsprach. Der erste Dialyse-Durchgang wurde bei 4 °C und die beiden folgenden bei RT durchgeführt. Das aktivierte AnxA5 wurde bei 4 °C aufbewahrt und innerhalb von drei Tagen verbraucht.

Vor der Umsetzung über freie Aminogruppen wurde AnxA5 nicht mit DTT behandelt, sondern lediglich über 18 h bei 4 °C gegen einen HEPES-Puffer (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, pH 7,4) dialysiert. Die Konzentration der AnxA5-Lösungen wurde mit Hilfe des BCA-Protein-nachweises ermittelt.

6.5.1. AnxA5-Peptid-VSOP

6.5.1.1. Synthese des AnxA5-Peptid-AnxA5-Konjugats mittels SPDP

Zur Herstellung des Konjugats AnxA5-K1.1a-AnxA5 (K1.2a) mittels SPDP wurde zunächst das eingesetzte Peptid P1 mit dem Kopplungsreagenz SPDP aktiviert. Dafür wurde wasserunlösliches SPDP frisch in DMSO (50 mM) gelöst und sofort 2 µl dieser SPDP-DMSO-Lösung zu 100 µl des in Reaktionspuffer (100 mM HEPES, pH 8,0) gelösten Peptids (0,5 mM) gegeben. Die Reaktion erfolgte bei 4 °C über 18 h auf einem Kippschüttler. Am Folgetag wurde unreaktiertes SPDP über Größenausschlusschromatographie abgetrennt und das aktivierte Peptid (SPDP-P1-SPDP, K1.1a) zur Umsetzung mit AnxA5 weiterverwendet. Die Analytik des aktivierten Peptids SPDP-P1-SPDP (K1.1a) erfolgte über HPLC und MALDI-TOF/MS und die Konzentration wurde durch Absorptionsmessung von Fluorescein mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes ermittelt. Das aktivierte Peptid war nach der Reinigung in einem 10 mM HEPES-Puffer mit 140 mM NaCl (pH 7,4) gelöst und wurde unverdünnt eingesetzt. Nach Aktivierung (DTT-Behandlung) und Dialyse war das AnxA5 in einem 25 mM HEPES-Puffer mit 140 mM NaCl und 1 mM EDTA (pH 7,4) gelöst und wurde ebenfalls unverdünnt eingesetzt. Die Umsetzung des aktivierten Peptids (100 µl, 5,5 µM) erfolgte durch Zugabe des aktivierten AnxA5 (13,6 µl, 161 µM) im vierfachen molaren Überschuss zum Peptid. Zur Verhinderung einer Aggregation des Reaktionsproduktes wurde gleich zu Beginn der Reaktion soviel einer 3 M NaCl-Lösung zugegeben, bis eine 500 mM NaCl-Konzentration erreicht wurde. Die Reaktion erfolgte über 18 h bei 4 °C auf einem Kippschüttler. Die Charakterisierung des Reaktionsproduktes AnxA5-K1.1a-AnxA5 (K1.2a) erfolgte über SDS-PAGE.

SPDP-P1-SPDP (K1.1a)

Ausbeute (UV/Vis): 10 %

HPLC: $t_{\text{Ret}} = 6,4$ min

MALDI/TOF-MS: $M_{\text{ber}} = 4378$ g/mol; $M_{\text{gef}} = 4378$ g/mol

AnxA5-K1.1a-AnxA5 (K1.2a)

Ausbeute (SDS-PAGE): 2,6 % (bezogen auf eingesetzte Peptidmenge)

6.5.1.2. Synthese des AnxA5-Peptid-AnxA5-Konjugats mittels Sulfo-SMCC

Im ersten Syntheseschritt wurde das eingesetzte Peptid P1 mit dem Kopplungsreagenz Sulfo-SMCC aktiviert. Dafür wurden 280 µl einer frisch hergestellten Sulfo-SMCC-Stammlösung (25 mM in 100 mM HEPES, pH 7,4) mit 420 µl der Peptid-Lösung (0,42 mM in 100 mM HEPES, pH 7,4) über 2 h bei RT auf einem Kippschüttler umgesetzt. Die Abtrennung von

überschüssigem Sulfo-SMCC erfolgte über Größenausschlusschromatographie und das aktivierte Peptid (SMCC-P1-SMCC, K1.3a) wurde mittels HPLC und MALDI-TOF/MS analysiert. Im zweiten Syntheseschritt erfolgte die Umsetzung des aktivierten AnxA5 mit dem aktivierten Peptid SMCC-P1-SMCC (K1.3a) durch Zugabe von 150 µl AnxA5 (131 µM in 25 mM HEPES-Puffer, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,4) zu 1000 µl SMCC-P1-SMCC (K1.3a) (6,1 µM in 10 mM HEPES, 140 mM NaCl, pH 7,4) bei 4 °C über 18 h auf einem Kippschüttler. Zur Stabilisierung des Reaktionsproduktes wurde zu Beginn der Reaktion soviel einer 3 M NaCl-Lösung zugegeben, bis der Reaktionsansatz eine NaCl-Konzentration von 500 mM erreicht hatte. Die Reinigung des Reaktionsproduktes AnxA5-K1.3a-AnxA5 (K1.4a) erfolgte über Größenausschlusschromatographie und die Charakterisierung mittels SDS-PAGE.

SMCC-P1-SMCC (K1.3a)

Ausbeute (UV/Vis): 7 %

HPLC: $t_{\text{Ret}} = 6,5$ min

MALDI/TOF-MS: $M_{\text{ber}} = 4424$ g/mol; $M_{\text{gef}} = 4428$ g/mol

AnxA5-K1.3a-AnxA5 (K1.4a)

Ausbeute (SDS-PAGE): 3,6 % (bezogen auf eingesetzte Peptidmenge)

6.5.1.3. Elektrostatische Beschichtung von VSOP mit AnxA5-Peptid-Konjugaten

Die elektrostatische Beschichtung der VSOP (081209F4) erfolgte durch Zugabe der VSOP-Suspension zur AnxA5-K1.3a-AnxA5-Lösung. In einem Reaktionsgefäß wurden dafür 500 µl der Protein-Lösung (17,5 µg/ml AnxA5-K1.3a-AnxA5 in 10 mM HEPES, 140 mM NaCl, pH 7,4) vorgelegt und mit 4,4 µl der VSOP-Suspension (11,6 mM Fe in H₂O) versetzt. Die Beschichtung erfolgte über 18 h bei 4 °C. Die Abtrennung von nicht gebundenem AnxA5 und AnxA5-K1.3a-AnxA5 erfolgte über die Nutzung von MACS®-Säulen (MS Säule der Firma *Miltenyi Biotec*, Bergisch Gladbach, Deutschland). Die Säule wurde mit 1 ml eines HEPES-Puffers (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, pH 7,4) gespült und äquilibriert. Nach Einspannen der Säule in den Magneten, wurden 250 µl der AnxA5-Peptid-VSOP auf die Säule aufgetragen und im Anschluss zweimal mit 1 ml HEPES-Puffer gewaschen, um nicht gebundenes Protein zu entfernen. Im Anschluss wurde die Säule aus dem Magneten entfernt und erneut 1 ml HEPES-Puffer auf die Säule aufgetragen, um die beschichteten Partikel zu eluieren. Die Fraktionen wurden tropfenweise in Reaktionsgefäßen gesammelt. Die Charakterisierung der AnxA5-Peptid-VSOP erfolgte durch Größenmessung über dynamische Lichtstreuung.

6.5.2. AnxA5-VSOP

6.5.2.1. Kovalente Bindung von AnxA5 an VSOP-Oberfläche

Vor der Umsetzung der VSOP (190411F3) wurden diese über 4 h gegen einen MES-Puffer (50 mM MES, pH 6,0) bei 4 °C dialysiert, um freies Citrat abzutrennen. Für die Aktivierung der Citrathülle wurden dann 288 µl VSOP-Suspension (30,5 mM Fe in 50 mM MES, pH 6,0) in einem Reaktionsgefäß vorgelegt und mit 122 µl Sulfo-NHS (250 mM in 50 mM MES, pH 6,0) und 40 µl EDC (250 mM in 50 mM MES, pH 6,0) versetzt. Nach 15 min Reaktionszeit bei RT auf einem Kippschüttler wurde überschüssiges Sulfo-NHS und EDC über Zentrifugenfilter (Amicon Ultracel-30, Zentrifugation pro Filtrat über 6 min bei 1500 x g) abgetrennt. Als Waschpuffer diente ein 50 mM MES-Puffer (pH 6,0). Zur Überprüfung der vollständigen Abtrennung von EDC und Sulfo-NHS wurden die Filtrate photometrisch untersucht (Messung des Absorptionsspektrums). Nach vollständiger Abtrennung wurden die aktivierten VSOP direkt zu 508 µl der AnxA5-Lösung (79,7 µM in 10 mM HEPES, 140 mM NaCl, pH 7,4) gegeben. Die Reaktion erfolgte bei 4 °C über 18 h auf einem Kippschüttler. Nicht gebundenes AnxA5 wurde über Zentrifugenfilter (Amicon Ultracel-100, Zentrifugation pro Filtrat über 4 min bei 1500 x g) abgetrennt, wobei ein 10 mM HEPES-Puffer mit 140 mM NaCl (pH 7,4) als Waschpuffer diente. Die Filtrate wurden hinsichtlich ihres Proteingehalts mit dem Bradford-Proteinnachweises untersucht. Die kovalent beschichteten AnxA5-VSOP wurden über native PAGE und Größenmessung (dynamische Lichtstreuung) charakterisiert. Die Stabilität der AnxA5-VSOP wurde mittels Größen- und Relaxivitätsmessungen in verschiedenen Medien untersucht. Die spezifische Bindung der AnxA5-VSOP an apoptotische Zellen wurde *in vitro* anhand eines Zellphantoms und *in vivo* in einem Ischämie-Reperfusion-Modell an der Maus untersucht.

6.5.2.2. Kovalente Bindung von M1234 an VSOP-Oberfläche

Die VSOP (190411F3) wurden zunächst über 4 h gegen einen MES-Puffer (50 mM MES, pH 6,0) bei 4 °C dialysiert. 144 µl der dialysierten VSOP-Suspension (30,5 mM Fe in 50 mM MES, pH 6,0) wurden in einem Reaktionsgefäß vorgelegt und mit 61 µl Sulfo-NHS (250 mM in 50 mM MES, pH 6,0) und 20 µl EDC (250 mM in 50 mM MES, pH 6,0) versetzt. Nach 15 min Reaktionszeit bei RT auf einem Kippschüttler wurden überschüssiges Sulfo-NHS und EDC über Zentrifugenfilter (Amicon Ultracel-30, Zentrifugation pro Filtrat über 6 min bei 1500 x g) abgetrennt. Zur Überprüfung der vollständigen Abtrennung von Sulfo-NHS / EDC wurden die Filtrate photometrisch untersucht (Messung des Absorptionsspektrums). Im Anschluss wurde die gereinigte VSOP-Suspension sofort zu 232 µl M1234-Lösung (87,3 µM in 10 mM HEPES, 140 mM NaCl, pH 7,4) gegeben. Die Reaktion erfolgte bei 4 °C über 18 h auf einem Kippschüttler. Die Reinigung und Charakterisierung der nicht-bindenden Variante M1234-VSOP erfolgte analog zu der Reinigung und Charakterisierung der AnxA5-VSOP.

6.5.2.3. Stabilitätsuntersuchung der AnxA5-VSOP

Mittels Größenmessung (dynamische Lichtstreuung) der hergestellten AnxA5-VSOP und Zugabe verschiedener Salzlösungen wurde die Stabilität der Partikel und ihr Aggregationsverhalten unter annähernd physiologischen Bedingungen untersucht. Die AnxA5-VSOP (0,56 mM Fe) wurden dafür zunächst in Wasser und Bindungspuffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1,8 mM CaCl₂, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, pH 7,4) und dann jeweils bei ansteigender CaCl₂-Konzentration (0,7 mM; 1,3 mM; 1,8 mM; 2,3 mM; 2,8 mM CaCl₂) gemessen. Außerdem wurden die AnxA5-VSOP zeitabhängig in Bindungspuffer mit 1,8 mM CaCl₂ gemessen.

Die Stabilität der AnxA5-VSOP in FCS und Blut wurde mittels Relaxivitätsmessungen untersucht. Es wurden dafür drei verschiedene Partikelkonzentrationen (0,25 mM; 0,5 mM; 0,75 mM Fe) in Wasser, FCS und Blut suspendiert und jeweils die T1- und T2-Relaxationszeiten der Partikelsuspensionen sowie der verschiedenen Medien (Leerwert) gemessen. Die in FCS suspendierten Proben wurden 24 h aufbewahrt und dann erneut gemessen. Zusätzlich wurden für die Stabilitätsuntersuchungen die T2-Relaxationszeiten der Partikel in zwei verschiedenen Konzentrationen (0,25 mM; 0,75 mM Fe) in Abhängigkeit von der Zeit gemessen. Als Medium dienten in dem Fall FCS sowie eine 1,8 mM CaCl₂-Lösung. Die T2-Relaxationszeiten wurden direkt nach dem Suspendieren der Partikel über 1 h und nach 24 h erneut über 1 h gemessen.

6.5.2.4. *In-vitro*-Untersuchung der spezifischen Bindung von AnxA5-VSOP an apoptotische Zellen

Die spezifische Bindung von AnxA5-VSOP an apoptotische Zellen wurde durch MRT-Messung eines Zellphantoms untersucht. Jurkat-T-Zellen wurden zunächst in 300-cm³-Kulturflaschen dünn ausgesät und über 96 h in RPMI-Medium (RPMI-1640, 10 % FCS, 1 % Penicillin / Streptomycin) kultiviert. Die Hälfte der Zellen wurde dann über 6 h mit Camptothecin (1 mM in DMSO, Zugabe von 8 µl pro ml Medium) inkubiert. Danach wurde jeweils 1 ml Zellsuspension entnommen, um die Anzahl apoptotischer Zellen mittels Durchflusszytometrie zu bestimmen. Dafür wurde die Zellsuspension über 5 min bei 445 x g zentrifugiert und das gewonnene Zellpellet mit 500 µl Bindungspuffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1,8 mM CaCl₂, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, pH 7,4) aufgenommen und zweimal mit je 500 µl Bindungspuffer gewaschen. Dann wurden die Zellen mit 0,2 µg AnnexinA5-FITC in 500 µl Bindungspuffer auf Eis über 10 min inkubiert und anschließend am Durchflusszytometer gemessen. Als Referenz dienten unbehandelte und behandelte Zellen, welche nicht mit AnnexinA5-FITC inkubiert wurden.

Nach Bestimmung der Anzahl apoptotischer Zellen wurden die unbehandelten und behandelten Zellen geerntet (jeweils ca. $2,5 \cdot 10^8$ Zellen) und in jeweils 30 ml Bindungspuffer aufgenommen. Die Zellsuspensionen wurden jeweils auf drei 15-ml-Zentrifugenröhrchenen aufgeteilt und mit je 10 ml Bindungspuffer gewaschen (Zentrifugation über 5 min bei 445 x g). Das erhaltene Zellpellet wurde dann in 7,5 ml Bindungspuffer aufgenommen und mit AnxA5-VSOP (1 µg Fe / ml) und M1234-VSOP (1 µg Fe / ml) über 10 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit je 10 ml Bindungspuffer gewaschen (Zentrifugation über 5 min bei 445 x g) und das Zellpellet am Ende in 100µl-Proberöhrchen überführt. Die Proben wurden im Kühlschrank gelagert und am Folgetag am MRT-Scanner gemessen. Kurz vor der MRT-Messung wurden die Zellpellets noch mit Wasser überschichtet und zentrifugiert (5 min, 445 x g). Als Probenmatrix diente ein 1%iges Agarosephantom, in welches die Proberöhrchen gesteckt wurden. Tabelle 6.8 fasst die verschiedenen Zellproben zusammen.

Tabelle 6.8: Übersicht der verschiedenen Zellproben und der jeweiligen Inkubationslösungen.

Probe	Behandlung der Zellen	Inkubationslösung
1		Bindungspuffer
2	kein Camptothecin	AnxA5-VSOP in Bindungspuffer (1 µg Fe / ml Bindungspuffer)
3		M1234-VSOP in Bindungspuffer (1 µg Fe / ml Bindungspuffer)
4		Bindungspuffer
5	6 h Camptothecin	AnxA5-VSOP in Bindungspuffer (1 µg Fe / ml Bindungspuffer)
6		M1234-VSOP in Bindungspuffer (1 µg Fe / ml Bindungspuffer)

6.5.2.5. *In-vivo*-Untersuchung der Signalintensitätshalbwertszeit von AnxA5-VSOP im Blut und der spezifischen Bindung von AnxA5-VSOP an apoptotische Zellen

Die **Bestimmung der Signalintensitätshalbwertszeit im Blut** von AnxA5-VSOP erfolgte in athymischen Nacktmäusen (weiblich) von *Charles River Laboratories* (Sulzfeld, Germany) und wurde durchgeführt von Franziska Appler (AG Schellenberger, Experimentelle Radiologie, *Charité - Universitätsmedizin Berlin*). Alle Versuche erfolgten in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz (genehmigtes Tierversuchsvorhaben 0246/08). Die Bestimmung der Halbwertszeiten erfolgte durch MRT-Messung der Signalintensitäten im Her-

zen der Maus. Nach Messung des Leerwerts im Herzen, wurden AnxA5-VSOP intravenös in die Schwanzvene (50 $\mu\text{mol Fe / kg}$) injiziert und die MRT-Messung wurde in regelmäßigen Abständen über einen Zeitraum von 2 h wiederholt. Die Signalintensitäten wurden in einem repräsentativen Bildausschnitt (*region of interest*, ROI) in der linken Herzkammer gemessen. Die Auswertung erfolgte mit der Software *OsiriX* Version 3.9.2, *ImageJ* Version 1.46r und *Prism* Version 5.0a.

Die **spezifische Bindung der AnxA5-VSOP** an apoptotische Zellen *in vivo* wurde an einem Ischämie-Reperfusion-Mausmodell untersucht [187] und von Howard Chen (AG David Sosnovik) am *Martinos Center for Biomedical Imaging (Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts)* durchgeführt. Die Versuche erfolgten in Übereinstimmung mit den Richtlinien des Unterausschusses *Research Animal Care* am *Massachusetts General Hospital*. Die Induktion von Apoptose im Herzen wurde durch ein Ischämie-Reperfusion-Modell mittels Ligation der linken Koronararterie über 35 min erreicht. Mit dem darauffolgenden Einsetzen der Reperfusion wurden AnxA5-VSOP bzw. M1234-VSOP intravenös in die Schwanzvene injiziert (3 mg Fe / kg). Die MRT-Messung erfolgte 3 h nach der Injektion. In einem Kontrollversuch wurde eine Maus mit gleicher Schädigung des Myokards jedoch ohne Partikelinjektion analog untersucht. Die Messung der Kontrollsonde M1234-VSOP erfolgte aufgrund technischer Probleme *ex vivo* (siehe Kapitel 6.4.11. Magnetresonanztomographie).

6.6. Synthese und Charakterisierung von PSOP

6.6.1. Synthese der Peptid-PEG-Konjugate

6.6.1.1. NHS-Kopplung

Für die Synthese von Peptid-PEG-Konjugaten über die NHS-Kopplung wurde zu frisch hergestellter Peptidlösung (5 mg/ml in 100 mM HEPES, pH 7,4) das gleiche Volumen einer frisch hergestellten NHS-PEG5000-Lösung (30 mM in 100 mM HEPES, pH 7,4) gegeben. Die Reaktion erfolgte bei 4 °C über 18 h auf einem Kippschüttler. Am Folgetag wurde überschüssiges NHS-PEG5000 und nicht umgesetztes Peptid über Größenausschlusschromatographie abgetrennt. Die Charakterisierung der Konjugate erfolgte über HPLC und SDS-PAGE. Die Konjugate MMP(Arg)-PEG5000 (K2) und MMP(Arg)-(PEG5000)₂ (K3) wurden zusätzlich über MALDI-TOF/MS charakterisiert.

Die folgenden Peptid-PEG-Konjugate wurden nach obiger allgemeiner Vorschrift synthetisiert. Die jeweiligen Aminosäuresequenzen der verschiedenen Peptide können Tabelle 6.1 entnommen werden.

MMP(Arg)-PEG5000 (K2)

Umsetzung von 258 μ l Peptidlösung (0,4 μ mol, 1,3 mg P2) mit 258 μ l NHS-PEG5000-Lösung (8 μ mol).

Ausbeute (UV/Vis): 42 %

HPLC: t_{Ret} = 9,4 min

MALDI/TOF-MS: M_{ber} = 8220 g/mol (mit M_{PEG} = 5000 g/mol); M_{gef} \approx 8000 g/mol

MMP(Arg)-(PEG5000)₂ (K3)

Umsetzung von 236 μ l Peptidlösung (0,35 μ mol, 1,2 mg P3) mit 236 μ l NHS-PEG5000-Lösung (7 μ mol).

Ausbeute (UV/Vis): 28 %

HPLC: t_{Ret} = 10,0 min

MALDI/TOF-MS: M_{ber} = 13430 g/mol (mit M_{PEG} = 5000 g/mol); M_{gef} \approx 13000 g/mol

(MMP(Arg)-(PEG5000)₂)-Cys-Dimer (K4)

Umsetzung von 345 μ l Peptidlösung (0,25 μ mol, 1,77 mg P4) mit 345 μ l NHS-PEG5000-Lösung (10 μ mol).

Ausbeute (UV/Vis): 41 %

HPLC: t_{Ret} = 10,3 min

6.6.1.2. Maleimid-Kopplung

Für die Synthese von Peptid-PEG-Konjugaten über die Maleimid-Kopplung wurde in einem Reaktionsgefäß frisch gelöstes Peptid (5-7,5 mg/ml in 100 mM HEPES, pH 7,0) vorgelegt und durch Zugabe des gleichen Volumens des frisch gelösten Mal-PEG5000 (1,5-1,7 mM in 100 mM HEPES, pH 7,0) zur Reaktion gebracht. Nach 2 h Reaktionszeit bei 4 °C wurde die Reaktion gestoppt, indem die nicht umgesetzten Reaktionspartner von dem Produkt über Größenausschlusschromatographie abgetrennt wurden. Die Charakterisierung der Konjugate erfolgte über HPLC und SDS-PAGE.

Die folgenden Peptid-PEG-Konjugate wurden nach obiger allgemeiner Vorschrift synthetisiert. Die jeweiligen Aminosäuresequenzen der verschiedenen Peptide können Tabelle 6.1 entnommen werden.

MMP(Lys)-PEG5000 (K5)

Umsetzung von 180 µl Peptidlösung (0,3 µmol, 0,9 mg P5) mit 180 µl Mal-PEG5000-Lösung (0,3 µmol).

Ausbeute (UV/Vis): 43 %

HPLC: $t_{\text{Ret}} = 9,4$ min

MMP(LysArgGly)-PEG5000 (K6)

Umsetzung von 200 µl Peptidlösung (0,4 µmol, 1,5 mg P6) mit 200 µl Mal-PEG5000-Lösung (0,3 µmol).

Ausbeute (UV/Vis): 65 %

HPLC: $t_{\text{Ret}} = 9,3$ min

6.6.2. Elektrostatische Beschichtung der VSOP mit Peptid-PEG-Konjugaten

Die elektrostatische Beschichtung der VSOP (190411F3) erfolgte durch Zugabe der VSOP-Suspension zum gleichen Volumen der jeweiligen Konjugatlösung. Die gewünschte Konzentration der jeweiligen Lösungen wurde durch Zugabe des nötigen Volumens an Wasser eingestellt. Erst nach Beschichtung der VSOP mit den Konjugaten wurden die nötigen Puffer-Substanzen und Salze zugesetzt. Die Stabilität sowie die enzymatische Aktivierbarkeit der elektrostatisch beschichteten PSOP wurde mittels Fluoreszenz- und Größenmessungen untersucht.

6.6.3. Kovalente Beschichtung der VSOP mit Peptid-PEG-Konjugaten

Die hier beschriebenen Vorschriften gelten für beide eingesetzten lysinreichen Peptid-PEG-Konjugate. Im Rahmen der Optimierung der kovalenten Anbindung der Konjugate an die Citrathülle der VSOP (190411F3) wurden drei verschiedene Ansätze untersucht:

- (1) Keine Reinigungsschritte vor und nach der Umsetzung mit den Konjugaten.
- (2) Reinigung der aktivierten VSOP vor der Umsetzung mit den Konjugaten (Abtrennung von überschüssigem EDC und Sulfo-NHS).
- (3) Reinigung der aktivierten VSOP vor der Umsetzung mit den Konjugaten (Abtrennung von überschüssigem EDC und Sulfo-NHS) sowie der kovalent beschichteten PSOP (Abtrennung von freiwerdendem Sulfo-NHS).

Die folgenden Vorschriften zur kovalenten Beschichtung schließen beide Reinigungsschritte mit ein. Die Vorschriften bei denen auf Reinigungsschritte verzichtet wurde sind jedoch analog und somit vollständig übertragbar und werden hier nicht gesondert aufgeführt.

6.6.3.1. Vorschrift zur kovalenten Anbindung von 10 bzw. 20 lysinreichen Peptid-PEG-Konjugaten an die Citratgruppen der VSOP

Vor der Umsetzung der VSOP (190411F3) wurden diese über 4 h gegen einen MES-Puffer (50 mM MES, pH 6,0) bei 4 °C dialysiert, um freies Citrat abzutrennen. Für die Aktivierung der Citrathülle wurden dann 180 µl VSOP-Suspension (18,1 mM Fe in 50 mM MES, pH 6,0) in einem Reaktionsgefäß vorgelegt und mit 15 µl Sulfo-NHS (250 mM in 50 mM MES, pH 6,0) und 5 µl EDC (250 mM in 50 mM MES, pH 6,0) versetzt. Nach 15 min Reaktionszeit bei RT auf einem Kippschüttler wurden überschüssiges Sulfo-NHS und EDC über Zentrifugenfilter (Amicon Ultracel-30, Zentrifugation pro Filtrat über 6 min bei 1500 x g) abgetrennt. Als Waschpuffer diente ein 50 mM MES-Puffer (pH 6,0). Zur Überprüfung der vollständigen Abtrennung von EDC und Sulfo-NHS wurden die Filtrate photometrisch untersucht (Messung des Absorptionsspektrums). Nach vollständiger Abtrennung wurden die aktivierten VSOP direkt zu 400 µl Konjugatlösung (12,5 bzw. 25 µM in 100 mM HEPES, pH 7,4) gegeben. Die Reaktion erfolgte bei 4 °C über 18 h auf einem Kippschüttler. Die erhaltenen PSOP wurden über Zentrifugenfilter (Amicon Ultracel-100, Zentrifugation pro Filtrat über 4 min bei 1500 x g) gereinigt. Als Waschpuffer diente hierbei ein 100 mM HEPES-Puffer (pH 7,4). Die Stabilität und die enzymatische Aktivierbarkeit der kovalent beschichteten PSOP wurde mittels Fluoreszenz- und Größenmessungen untersucht.

6.6.3.2. Vorschrift zur kovalenten Anbindung von 5 lysinreichen Peptid-PEG-Konjugaten an die Citratgruppen der VSOP

Vor der Umsetzung der VSOP (190411F3) wurden diese über 4 h gegen einen MES-Puffer (50 mM MES, pH 6,0) bei 4 °C dialysiert, um freies Citrat abzutrennen. Für die Aktivierung der Citrathülle wurden dann 270 µl VSOP-Suspension (18,1 mM Fe in 50 mM MES, pH 6,0) in einem Reaktionsgefäß vorgelegt und mit 22,5 µl Sulfo-NHS (250 mM in 50 mM MES, pH 6,0) und 7,5 µl EDC (250 mM in 50 mM MES, pH 6,0) versetzt. Nach 15 min Reaktionszeit bei RT auf einem Kippschüttler wurden überschüssiges Sulfo-NHS und EDC über Zentrifugenfilter (Amicon Ultracel-30, Zentrifugation pro Filtrat über 6 min bei 1500 x g) abgetrennt. Als Waschpuffer diente ein 50 mM MES-Puffer (pH 6,0). Zur Überprüfung der vollständigen Abtrennung von EDC und Sulfo-NHS wurden die Filtrate photometrisch untersucht (Messung des Absorptionsspektrums). Nach vollständiger Abtrennung wurden die aktivierten VSOP direkt zu 300 µl Konjugatlösung (12,5 µM in 100 mM HEPES, pH 7,4) gegeben. Die Reaktion erfolgte bei 4 °C über 18 h auf einem Kippschüttler. Die Reinigung und Charakterisierung der PSOP mit 5 Konjugaten erfolgte analog zu den PSOP mit 10 bzw. 20 Konjugaten.

6.6.4. Untersuchung des optimalen Verhältnisses aus Konjugat zu VSOP

Um zu untersuchen, wie viel Konjugat auf der Oberfläche der VSOP binden kann, wurden VSOP elektrostatisch mit verschiedenen Mengen an Konjugat beschichtet. Dafür wurden jeweils 50 µl Konjugatlösung mit ansteigender Konzentration (0,4-12 µM Konjugat [1-30 Konj / VSOP]) vorgelegt, mit 50 µl VSOP-Suspension (2,6 mM Fe; 0,4 µM VSOP) versetzt und mit Wasser auf 250 µl aufgefüllt. Zusätzlich wurden 50 µl Konjugatlösung (0,4-12 µM Konjugat) mit Wasser ebenfalls auf 250 µl aufgefüllt. Die Fluoreszenz der Konjugatlösung und der PSOP-Suspension wurden gemessen und im Anschluss daran wurden 50 µl der PSOP-Suspension entnommen und die Größe mittels dynamischer Lichtstreuung gemessen.

6.6.5. Untersuchung des PSOP-Verhaltens unter Einfluss von NaCl

Mittels Größenmessung der hergestellten PSOP und Zugabe von NaCl wurde untersucht, wie fest die Konjugate auf der VSOP-Oberfläche gebunden sind und ob die NaCl-Zugabe eine Aggregation der Partikel bewirkt. Dafür wurden zunächst 10 µl PSOP (2,6 mM Fe) mit 40 µl Wasser versetzt und dann gemessen. Durch Zugabe von 3 M NaCl-Lösung wurde der NaCl-Gehalt schrittweise erhöht (100 mM; 200 mM; 300 mM; 400 mM; 500 mM; 600 mM NaCl) und die Größe der PSOP bei jeder Konzentration erneut gemessen.

Über Messung der Fluoreszenz wurde untersucht, ob die Zugabe von NaCl eine Dissoziation und Ablösung der Fluorescein-markierten Konjugate von der Oberfläche bewirkt. Dafür wurden zunächst 50 µl PSOP (2,6 mM Fe) mit 200 µl Wasser versetzt und dann gemessen. Durch Zugabe von 3 M NaCl-Lösung wurde der NaCl-Gehalt ebenfalls schrittweise erhöht (100 mM; 200 mM; 300 mM; 400 mM; 500 mM; 600 mM NaCl) und die Fluoreszenz der Suspension bei jeder Konzentration erneut gemessen.

6.6.6. Untersuchung der enzymatischen Aktivierbarkeit der PSOP

Die enzymatische Aktivierbarkeit der PSOP wurde durch Messung der Fluoreszenz und der Größe *in vitro* untersucht. Für die Größenmessung wurden 10 µl der PSOP-Suspension (2,6 mM Fe) mit 40 µl Enzympuffer (10 mM HEPES-Puffer, 140 mM NaCl, 1,3 mM CaCl₂ und 50 µM ZnCl₂, pH 7,4) versetzt und die Probe dann über 2 h gemessen. Danach wurde das Enzym MMP-9 (1,5 U) zugesetzt und die Größe über weitere 2 h gemessen. Für die Messung der Fluoreszenz wurden 50 µl der PSOP-Suspension (2,6 mM Fe) mit 200 µl Enzympuffer versetzt und die Probe dann ebenfalls über 2 h gemessen. Danach wurde das Enzym MMP-9 (7,4 U) zugesetzt und die Fluoreszenz über weitere 2 h gemessen. Die Aktivität des Enzyms betrug in beiden Fällen 29,6 U/ml.

6.6.7. Untersuchung möglicher Nebenreaktionen der Konjugate mit EDC und Sulfo-NHS sowie der enzymatischen Hemmung durch Sulfo-NHS

Für die Untersuchung möglicher Nebenreaktionen der Konjugate mit Sulfo-NHS und EDC wurde Konjugatlösung mit Sulfo-NHS sowie EDC versetzt. Zunächst wurden dafür frisch hergestellte Sulfo-NHS- und EDC-Lösungen über 15 min bei RT aufbewahrt. Danach wurden 45 µl Konjugatlösung (27 µM in 100 mM HEPES, pH 7,4) mit 15 µl Sulfo-NHS (30 mM bzw. 60 mM in 50 mM MES, pH 6,0) und 15 µl EDC (10 mM bzw. 20 mM in 50 mM MES, pH 6,0) versetzt und über Nacht inkubiert. Nach 18 h wurde Enzympuffer sowie das Enzym MMP-9 zugesetzt und der Ansatz nach weiteren 2 h mittels SDS-PAGE und HPLC untersucht. Die jeweiligen Inkubationszeiten entsprachen dabei denen der PSOP-Synthese sowie der Untersuchung der enzymatischen Aktivierbarkeit der PSOP. Für die Untersuchungen mittels SDS-PAGE wurden 5 µl des Gemisches aus Konjugat und Sulfo-NHS / EDC mit 15 µl Enzympuffer und dem Enzym MMP-9 (0,5 U) versetzt. Für die Untersuchungen mittels HPLC wurden 20 µl des Gemisches aus Konjugat und Sulfo-NHS / EDC mit 20 µl Enzympuffer und dem Enzym MMP-9 (3,0 U) versetzt. Als Referenz diente in beiden Fällen Konjugatlösung, welche anstelle mit Sulfo-NHS und EDC lediglich mit MES-Puffer versetzt wurde.

Die Enzymhemmung durch Sulfo-NHS wurde durch Inkubation elektrostatisch beschichteter PSOP mit Sulfo-NHS und anschließender Größen- und Fluoreszenzmessung untersucht. Für die Größenmessung wurden 10 µl der PSOP-Suspension (2,6 mM Fe) mit 40 µl Enzympuffer (10 mM HEPES-Puffer, 140 mM NaCl, 1,3 mM CaCl₂ und 50 µM ZnCl₂, pH 7,4) sowie 1 µl Sulfo-NHS (2,5 mM in Enzympuffer) versetzt und die Probe dann über 2 h gemessen. Danach wurde das Enzym MMP-9 (1,48 U) zugesetzt und die Größe über weitere 2 h gemessen. Für die Messung der Fluoreszenz wurden 50 µl der PSOP-Suspension (2,6 mM Fe) mit 200 µl Enzympuffer versetzt sowie 5 µl Sulfo-NHS (2,5 mM in Enzympuffer) und die Probe dann ebenfalls über 2 h gemessen. Danach wurde das Enzym MMP-9 (7,4 U) zugesetzt und die Fluoreszenz über weitere 2 h gemessen. Die Aktivität des Enzyms betrug in beiden Fällen 29,6 U/ml.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] R. Weissleder, U. Mahmood, Molecular imaging. *Radiology*. **(2001)** 219, 316-33.
- [2] M. Rudin, R. Weissleder, Molecular imaging in drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov*. **(2003)** 2, 123-31.
- [3] T. F. Massoud, S. S. Gambhir, Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light. *Genes Dev*. **(2003)** 17, 545-80.
- [4] C. Lutzweiler, D. Razansky, Optoacoustic Imaging and Tomography: Reconstruction Approaches and Outstanding Challenges in Image Performance and Quantification. *Sensors*. **(2013)** 13, 7345-84.
- [5] R. Weissleder, M. J. Pittet, Imaging in the era of molecular oncology. *Nature*. **(2008)** 452, 580-9.
- [6] C. B. Thompson, Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. **(1995)** 267, 1456-62.
- [7] G. A. van Tilborg, E. Vucic, G. J. Strijkers, D. P. Cormode, V. Mani, T. Skajaa, C. P. Reutelingsperger, Z. A. Fayad, W. J. Mulder, K. Nicolay, Annexin A5-functionalized bimodal nanoparticles for MRI and fluorescence imaging of atherosclerotic plaques. *Bioconjug Chem*. **(2010)** 21, 1794-803.
- [8] H. Kenis, H. R. Zandbergen, L. Hofstra, A. D. Petrov, E. A. Dumont, F. D. Blankenberg, N. Haider, N. Bitsch, M. Gijbels, J. W. Verjans, *et al.*, Annexin A5 uptake in ischemic myocardium: demonstration of reversible phosphatidylserine externalization and feasibility of radionuclide imaging. *J Nucl Med*. **(2010)** 51, 259-67.
- [9] H. H. Chen, L. Josephson, D. E. Sosnovik, Imaging of apoptosis in the heart with nanoparticle technology. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. **(2011)** 3, 86-99.
- [10] F. G. Blankenberg, J. F. Tait, H. W. Strauss, Apoptotic cell death: its implications for imaging in the next millennium. *Eur J Nucl Med*. **(2000)** 27, 359-67.
- [11] F. G. Blankenberg, In vivo detection of apoptosis. *J Nucl Med*. **(2008)** 49 Suppl 2, 81S-95S.
- [12] C. Bremer, C. H. Tung, R. Weissleder, In vivo molecular target assessment of matrix metalloproteinase inhibition. *Nat Med*. **(2001)** 7, 743-8.

- [13] E. Schellenberger, F. Rudloff, C. Warmuth, M. Taupitz, B. Hamm, J. Schnorr, Protease-Specific Nanosensors for Magnetic Resonance Imaging. *Bioconj Chem.* **(2008)** 19, 2440-5.
- [14] J. Hu, P. E. Van den Steen, Q. X. Sang, G. Opdenakker, Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases. *Nat Rev Drug Discov.* **(2007)** 6, 480-98.
- [15] M. Egeblad, Z. Werb, New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer.* **(2002)** 2, 161-74.
- [16] D. Schuppan, M. Ruehl, R. Somasundaram, E. G. Hahn, Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis.* **(2001)** 21, 351-72.
- [17] E. Schellenberger, J. Schnorr, C. Reutelingsperger, L. Ungethüm, W. Meyer, M. Taupitz, B. Hamm, Linking proteins with anionic nanoparticles via protamine: ultrasmall protein-coupled probes for magnetic resonance imaging of apoptosis. *Small.* **(2008)** 4, 225-30.
- [18] L. Hofstra, I. H. Liem, E. A. Dumont, H. H. Boersma, W. L. van Heerde, P. A. Doevendans, E. De Muinck, H. J. Wellens, G. J. Kemerink, C. P. Reutelingsperger, *et al.*, Visualisation of cell death in vivo in patients with acute myocardial infarction. *Lancet.* **(2000)** 356, 209-12.
- [19] C. P. Reutelingsperger, E. Dumont, P. W. Thimister, H. van Genderen, H. Kenis, S. van de Eijnde, G. Heidendal, L. Hofstra, Visualization of cell death in vivo with the annexin A5 imaging protocol. *J Immunol Methods.* **(2002)** 265, 123-32.
- [20] E. A. Schellenberger, A. Bogdanov, A. Petrovsky, V. Ntziachristos, R. Weissleder, L. Josephson, Optical imaging of apoptosis as a biomarker of tumor response to chemotherapy. *Neoplasia.* **(2003)** 5, 187-92.
- [21] E. S. Olson, T. Jiang, T. A. Aguilera, Q. T. Nguyen, L. G. Ellies, M. Scadeng, R. Y. Tsien, Activatable cell penetrating peptides linked to nanoparticles as dual probes for in vivo fluorescence and MR imaging of proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **(2010)** 107, 4311-6.
- [22] J. F. Kerr, A. H. Wyllie, A. R. Currie, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* **(1972)** 26, 239-57.
- [23] L. Galluzzi, I. Vitale, J. M. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny, T. M. Dawson, V. L. Dawson, W. S. El-Deiry, S. Fulda, *et al.*, Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* **(2012)** 19, 107-20.
- [24] G. Niu, X. Chen, Apoptosis imaging: beyond annexin V. *J Nucl Med.* **(2010)** 51, 1659-62.
- [25] R. A. Gottlieb, R. N. Kitsis, Seeing death in the living. *Nat Med.* **(2001)** 7, 1277-8.
- [26] M. Leist, M. Jäättelä, Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **(2001)** 2, 589-98.
- [27] I. Böhm, H. Schild, Apoptosis: the complex scenario for a silent cell death. *Mol Imaging Biol.* **(2003)** 5, 2-14.

-
- [28] F. Blankenberg, C. Mari, H. W. Strauss, Imaging cell death in vivo. *Q J Nucl Med.* **(2003)** 47, 337-48.
- [29] J. Savill, C. Gregory, C. Haslett, Cell biology. Eat me or die. *Science.* **(2003)** 302, 1516-7.
- [30] K. Schutters, C. Reutelingsperger, Phosphatidylserine targeting for diagnosis and treatment of human diseases. *Apoptosis.* **(2010)** 15, 1072-82.
- [31] H. O. van Genderen, H. Kenis, L. Hofstra, J. Narula, C. P. Reutelingsperger, Extracellular annexin A5: functions of phosphatidylserine-binding and two-dimensional crystallization. *Biochim Biophys Acta.* **(2008)** 1783, 953-63.
- [32] R. Kaplan, M. Jaye, W. H. Burgess, D. D. Schlaepfer, H. T. Haigler, Cloning and expression of cDNA for human endonexin II, a Ca²⁺ and phospholipid binding protein. *J Biol Chem.* **(1988)** 263, 8037-43.
- [33] R. Huber, J. Römisch, E. P. Paques, The crystal and molecular structure of human annexin V, an anticoagulant protein that binds to calcium and membranes. *EMBO J.* **(1990)** 9, 3867-74.
- [34] R. Huber, M. Schneider, I. Mayr, J. Römisch, E. P. Paques, The calcium binding sites in human annexin V by crystal structure analysis at 2.0 Å resolution. Implications for membrane binding and calcium channel activity. *FEBS Lett.* **(1990)** 275, 15-21.
- [35] J. Sopkova, M. Renouard, A. Lewit-Bentley, The crystal structure of a new high-calcium form of annexin V. *J Mol Biol.* **(1993)** 234, 816-25.
- [36] C. P. Reutelingsperger, G. Hornstra, H. C. Hemker, Isolation and partial purification of a novel anticoagulant from arteries of human umbilical cord. *Eur J Biochem.* **(1985)** 151, 625-9.
- [37] C. P. Reutelingsperger, J. M. Kop, G. Hornstra, H. C. Hemker, Purification and characterization of a novel protein from bovine aorta that inhibits coagulation. Inhibition of the phospholipid-dependent factor-Xa-catalyzed prothrombin activation, through a high-affinity binding of the anticoagulant to the phospholipids. *Eur J Biochem.* **(1988)** 173, 171-8.
- [38] J. H. Rand, X. X. Wu, H. A. Andree, C. J. Lockwood, S. Guller, J. Scher, P. C. Harpel, Pregnancy loss in the antiphospholipid-antibody syndrome--a possible thrombogenic mechanism. *N Engl J Med.* **(1997)** 337, 154-60.
- [39] H. Kenis, H. van Genderen, N. M. Deckers, P. A. Lux, L. Hofstra, J. Narula, C. P. Reutelingsperger, Annexin A5 inhibits engulfment through internalization of PS-expressing cell membrane patches. *Exp Cell Res.* **(2006)** 312, 719-26.
- [40] L. E. Munoz, S. Franz, F. Pausch, B. Fürnrohr, A. Sheriff, B. Vogt, P. M. Kern, W. Baum, C. Stach, D. von Laer, *et al.*, The influence on the immunomodulatory effects of dying and dead cells of Annexin V. *J Leukoc Biol.* **(2007)** 81, 6-14.
- [41] V. Monceau, Y. Belikova, G. Kratassiouk, D. Charue, E. Camors, C. Communal, P. Trouvé, F. Russo-Marie, D. Charlemagne, Externalization of endogenous annexin A5 participates in apoptosis of rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res.* **(2004)** 64, 496-506.
- [42] C. Gidon-Jeangirard, B. Hugel, V. Holl, F. Toti, J. L. Laplanche, D. Meyer, J. M. Freysinet, Annexin V delays apoptosis while exerting an external constraint preventing the
-

- release of CD4+ and PrPc+ membrane particles in a human T lymphocyte model. *J Immunol.* **(1999)** 162, 5712-8.
- [43] D. Hubmacher, S. S. Apte, The biology of the extracellular matrix: novel insights. *Curr Opin Rheumatol.* **(2013)** 25, 65-70.
- [44] M. A. Karsdal, M. J. Nielsen, J. M. Sand, K. Henriksen, F. Genovese, A. C. Bay-Jensen, S. Victoria, J. I. Adamkewicz, C. Christiansen, D. J. Leeming, Extracellular Matrix Remodeling: The Common Denominator in Connective Tissue Diseases. *Assay Drug Dev Technol.* **(2012)** 11, 70-92.
- [45] G. L. Cromar, X. Xiong, E. Chautard, S. Ricard-Blum, J. Parkinson, Toward a systems level view of the ECM and related proteins: a framework for the systematic definition and analysis of biological systems. *Proteins.* **(2012)** 80, 1522-44.
- [46] B. Leitinger, Transmembrane collagen receptors. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **(2011)** 27, 265-90.
- [47] J. S. Rao, Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. *Nat Rev Cancer.* **(2003)** 3, 489-501.
- [48] E. Baramova, J. M. Foidart, Matrix metalloproteinase family. *Cell Biol Int.* **(1995)** 19, 239-42.
- [49] D. Rodríguez, C. J. Morrison, C. M. Overall, Matrix metalloproteinases: what do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. *Biochim Biophys Acta.* **(2010)** 1803, 39-54.
- [50] C. M. Vos, S. Gartner, R. M. Ransohoff, J. C. McArthur, L. Wahl, L. Sjulson, E. Hunter, K. Conant, Matrix metalloproteinase-9 release from monocytes increases as a function of differentiation: implications for neuroinflammation and neurodegeneration. *J Neuroimmunol.* **(2000)** 109, 221-7.
- [51] H. E. Turner, Z. Nagy, M. M. Esiri, A. L. Harris, J. A. Wass, Role of matrix metalloproteinase 9 in pituitary tumor behavior. *J Clin Endocrinol Metab.* **(2000)** 85, 2931-5.
- [52] G. Bergers, R. Brekken, G. McMahon, T. H. Vu, T. Itoh, K. Tamaki, K. Tanzawa, P. Thorpe, S. Itohara, Z. Werb, *et al.*, Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol.* **(2000)** 2, 737-44.
- [53] E. Schellenberger, Bioresponsive nanosensors in medical imaging. *J R Soc Interface.* **(2010)** 7 Suppl 1, S83-91.
- [54] G. Molineux, Pegylation: engineering improved pharmaceuticals for enhanced therapy. *Cancer Treat Rev.* **(2002)** 28 Suppl A, 13-6.
- [55] R. Weissleder, Scaling down imaging: molecular mapping of cancer in mice. *Nat Rev Cancer.* **(2002)** 2, 11-8.
- [56] H. Nakamura, N. Ito, F. Kotake, Y. Mizokami, T. Matsuoka, Tumor-detecting capacity and clinical usefulness of SPIO-MRI in patients with hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol.* **(2000)** 35, 849-55.
- [57] M. R. Makowski, G. Varma, A. J. Wiethoff, A. Smith, K. Mattock, C. H. Jansen, A. Warley, M. Taupitz, T. Schaeffter, R. M. Botnar, Noninvasive assessment of athe-

- rosclerotic plaque progression in ApoE^{-/-} mice using susceptibility gradient mapping. *Circ Cardiovasc Imaging*. (2011) 4, 295-303.
- [58] C. Corot, P. Robert, J. M. Idée, M. Port, Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging. *Adv Drug Deliv Rev*. (2006) 58, 1471-504.
- [59] M. Taupitz, S. Wagner, J. Schnorr, I. Kravec, H. Pilgrimm, H. Bergmann-Fritsch, B. Hamm, Phase I clinical evaluation of citrate-coated monocrystalline very small superparamagnetic iron oxide particles as a new contrast medium for magnetic resonance imaging. *Invest Radiol*. (2004) 39, 394-405.
- [60] C. Warmuth, J. Schnorr, N. Kaufels, S. Wagner, H. Pilgrimm, B. Hamm, M. Taupitz, Whole-heart coronary magnetic resonance angiography: contrast-enhanced high-resolution, time-resolved 3D imaging. *Invest Radiol*. (2007) 42, 550-7.
- [61] S. Wagner, J. Schnorr, H. Pilgrimm, B. Hamm, M. Taupitz, Monomer-coated very small superparamagnetic iron oxide particles as contrast medium for magnetic resonance imaging: preclinical in vivo characterization. *Invest Radiol*. (2002) 37, 167-77.
- [62] J. W. Bulte, D. L. Kraitchman, Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging. *NMR Biomed*. (2004) 17, 484-99.
- [63] M. Kartachova, R. L. Haas, R. A. Olmos, F. J. Hoebbers, N. van Zandwijk, M. Verheij, In vivo imaging of apoptosis by 99mTc-Annexin V scintigraphy: visual analysis in relation to treatment response. *Radiother Oncol*. (2004) 72, 333-9.
- [64] H. Kratz, A. Haeckel, R. Michel, L. Schönzart, U. Hanisch, B. Hamm, E. Schellenberger, Straightforward thiol-mediated protein labelling with DTPA: Synthesis of a highly active ¹¹¹In-annexin A5-DTPA tracer. *EJNMMI Res*. (2012) 2, 17.
- [65] H. H. Chen, Y. Feng, M. Zhang, W. Chao, L. Josephson, S. Y. Shaw, D. E. Sosnovik, Protective effect of the apoptosis-sensing nanoparticle AnxCLIO-Cy5.5. *Nanomedicine*. (2012) 8, 291-8.
- [66] M. De Saint-Hubert, F. M. Mottaghy, K. Vunckx, J. Nuyts, H. Fonge, K. Prinsen, S. Stroobants, L. Mortelmans, N. Deckers, L. Hofstra, *et al.*, Site-specific labeling of 'second generation' annexin V with 99mTc(CO)₃ for improved imaging of apoptosis in vivo. *Bioorg Med Chem*. (2010) 18, 1356-63.
- [67] D. E. Sosnovik, M. Nahrendorf, P. Panizzi, T. Matsui, E. Aikawa, G. Dai, L. Li, F. Reynolds, G. W. Dorn, R. Weissleder, *et al.*, Molecular MRI detects low levels of cardiomyocyte apoptosis in a transgenic model of chronic heart failure. *Circ Cardiovasc Imaging*. (2009) 2, 468-75.
- [68] N. Cauchon, R. Langlois, J. A. Rousseau, G. Tessier, J. Cadorette, R. Lecomte, D. J. Hunting, R. A. Pavan, S. K. Zeisler, J. E. van Lier, PET imaging of apoptosis with (64)Cu-labeled streptavidin following pretargeting of phosphatidylserine with biotinylated annexin-V. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. (2007) 34, 247-58.
- [69] E. A. Schellenberger, A. Bogdanov, D. Högemann, J. Tait, R. Weissleder, L. Josephson, Annexin V-CLIO: a nanoparticle for detecting apoptosis by MRI. *Mol Imaging*. (2002) 1, 102-7.
- [70] E. A. Schellenberger, D. Sosnovik, R. Weissleder, L. Josephson, Magneto/optical annexin V, a multimodal protein. *Bioconjug Chem*. (2004) 15, 1062-7.

- [71] D. E. Sosnovik, E. A. Schellenberger, M. Nahrendorf, M. S. Novikov, T. Matsui, G. Dai, F. Reynolds, L. Grazette, A. Rosenzweig, R. Weissleder, *et al.*, Magnetic resonance imaging of cardiomyocyte apoptosis with a novel magneto-optical nanoparticle. *Magn Reson Med.* **(2005)** 54, 718-24.
- [72] T. Förster, Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik.* **(1948)** 437, 55-75.
- [73] J. R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer, Berlin. **(2006)**.
- [74] R. Weissleder, C. H. Tung, U. Mahmood, A. Bogdanov, In vivo imaging of tumors with protease-activated near-infrared fluorescent probes. *Nat Biotechnol.* **(1999)** 17, 375-8.
- [75] T. N. Grossmann, L. Röglin, O. Seitz, Triplex molecular beacons as modular probes for DNA detection. *Angew Chem Int Ed Engl.* **(2007)** 46, 5223-5.
- [76] S. Thurley, L. Röglin, O. Seitz, Hairpin peptide beacon: dual-labeled PNA-peptide-hybrids for protein detection. *J Am Chem Soc.* **(2007)** 129, 12693-5.
- [77] A. Y. Louie, M. M. Hüber, E. T. Ahrens, U. Rothbächer, R. Moats, R. E. Jacobs, S. E. Fraser, T. J. Meade, In vivo visualization of gene expression using magnetic resonance imaging. *Nat Biotechnol.* **(2000)** 18, 321-5.
- [78] L. Josephson, J. M. Perez, R. Weissleder, Magnetic Nanosensors for the Detection of Oligonucleotide Sequences. *Angewandte Chemie.* **(2001)** 113, 3304-6.
- [79] J. M. Perez, L. Josephson, T. O'Loughlin, D. Högemann, R. Weissleder, Magnetic relaxation switches capable of sensing molecular interactions. *Nat Biotechnol.* **(2002)** 20, 816-20.
- [80] L. Matuszewski, B. Tombach, W. Heindel, C. Bremer, Molekulare und parametrische Bildgebung mit Eisenoxiden. *Radiologe.* **(2007)** 47, 34-42.
- [81] I. Koh, L. Josephson, Magnetic nanoparticle sensors. *Sensors (Basel).* **(2009)** 9, 8130-45.
- [82] E. J. Cha, E. S. Jang, I. C. Sun, I. J. Lee, J. H. Ko, Y. I. Kim, I. C. Kwon, K. Kim, C. H. Ahn, Development of MRI/NIRF 'activatable' multimodal imaging probe based on iron oxide nanoparticles. *J Control Release.* **(2011)** 155, 152-8.
- [83] B. Jastrzebska, R. Lebel, H. Therriault, J. O. McIntyre, E. Escher, B. Guérin, B. Paquette, W. A. Neugebauer, M. Lepage, New enzyme-activated solubility-switchable contrast agent for magnetic resonance imaging: from synthesis to in vivo imaging. *J Med Chem.* **(2009)** 52, 1576-81.
- [84] M. Reiser, *Magnetresonanztomographie*. Springer, Berlin. **(1997)**.
- [85] H. Morneburg, *Bildgebende Systeme für die medizinische Diagnostik : Röntgendiagnostik und Angiographie, Computertomographie, Nuklearmedizin, Magnetresonanztomographie, Sonographie, integrierte Informationssysteme*. Publicis MCD Verlag, Erlangen. **(1995)**.
- [86] D. Weishaupt, V. D. Köchli, B. Marincek, *Wie funktioniert MRI?: eine Einführung in Physik und Funktionsweise der Magnetresonanzbildgebung*. Springer, Berlin. **(2009)**.

-
- [87] R. Weissleder, G. Elizondo, L. Josephson, C. C. Compton, C. J. Fretz, D. D. Stark, J. T. Ferrucci, Experimental lymph node metastases: enhanced detection with MR lymphography. *Radiology*. **(1989)** 171, 835-9.
- [88] G. T. Hermanson, *Bioconjugate techniques*. Academic Press, Amsterdam. **(2008)**.
- [89] S. J. Hurst, *Biomedical nanotechnology methods and protocols*. Humana Press, New York. **(2011)**.
- [90] S. S. Wong, D. M. Jameson, S. S. Wong, *Chemistry of protein and nucleic acid cross-linking and conjugation*. Taylor & Francis/CRC Press, Boca Raton. **(2012)**.
- [91] D. A. Stetsenko, A. A. Arzumanov, V. A. Korshun, M. J. Gait, Peptide Conjugates of Oligonucleotides As Enhanced Antisense Agents. *Molecular Biology*. **(2000)** 34, 852-9.
- [92] V. Marchán, L. Debéthune, E. Pedroso, A. Grandas, Stabilization of DNA duplexes by covalently-linked peptides. *Tetrahedron*. **(2004)** 60, 5461-9.
- [93] N. Venkatesan, B. H. Kim, Peptide conjugates of oligonucleotides: synthesis and applications. *Chem Rev*. **(2006)** 106, 3712-61.
- [94] K. Knop, R. Hoogenboom, D. Fischer, U. S. Schubert, Poly(ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives. *Angew Chem Int Ed Engl*. **(2010)** 49, 6288-308.
- [95] H. Rehm, *Der Experimentator: Proteinbiochemie, Proteomics*. Elsevier, München. **(2006)**.
- [96] J. Klohs, J. Steinbrink, R. Bourayou, S. Mueller, R. Cordell, K. Licha, M. Schirner, U. Dirnagl, U. Lindauer, A. Wunder, Near-infrared fluorescence imaging with fluorescently labeled albumin: a novel method for non-invasive optical imaging of blood-brain barrier impairment after focal cerebral ischemia in mice. *J Neurosci Methods*. **(2009)** 180, 126-32.
- [97] W. Arap, R. Pasqualini, E. Ruoslahti, Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science*. **(1998)** 279, 377-80.
- [98] A. Petrovsky, E. Schellenberger, L. Josephson, R. Weissleder, A. Bogdanov, Near-infrared fluorescent imaging of tumor apoptosis. *Cancer Res*. **(2003)** 63, 1936-42.
- [99] I. Pastan, R. Hassan, D. J. Fitzgerald, R. J. Kreitman, Immunotoxin therapy of cancer. *Nat Rev Cancer*. **(2006)** 6, 559-65.
- [100] S. Y. Hwang, S. H. Cho, B. H. Lee, Y. J. Song, E. K. Lee, Cellular imaging assay for early evaluation of an apoptosis inducer. *Apoptosis*. **(2011)** 16, 1068-75.
- [101] J. Kalia, R. T. Raines, Advances in Bioconjugation. *Curr Org Chem*. **(2010)** 14, 138-47.
- [102] W. R. Algar, D. E. Prasuhn, M. H. Stewart, T. L. Jennings, J. B. Blanco-Canosa, P. E. Dawson, I. L. Medintz, The controlled display of biomolecules on nanoparticles: a challenge suited to bioorthogonal chemistry. *Bioconjug Chem*. **(2011)** 22, 825-58.

- [103] K. E. Sapsford, W. R. Algar, L. Berti, K. B. Gemmill, B. J. Casey, E. Oh, M. H. Stewart, I. L. Medintz, Functionalizing nanoparticles with biological molecules: developing chemistries that facilitate nanotechnology. *Chem Rev.* **(2013)** 113, 1904-2074.
- [104] E. A. Schellenberger, R. Weissleder, L. Josephson, Optimal modification of annexin V with fluorescent dyes. *Chembiochem.* **(2004)** 5, 271-4.
- [105] R. M. de Lorimier, J. J. Smith, M. A. Dwyer, L. L. Looger, K. M. Sali, C. D. Paavola, S. S. Rizk, S. Sadigov, D. W. Conrad, L. Loew, *et al.*, Construction of a fluorescent biosensor family. *Protein Sci.* **(2002)** 11, 2655-75.
- [106] D. G. Smyth, O. O. Blumenfeld, W. Konigsberg, Reactions of N-ethylmaleimide with peptides and amino acids. *Biochem J.* **(1964)** 91, 589-95.
- [107] C. F. Brewer, J. P. Riehm, Evidence for Possible Nonspecific Reactions between N-Ethylmaleimide and Proteins. *Anal Biochem.* **(1967)** 18, 248-55.
- [108] P. McCaldon, P. Argos, Oligopeptide biases in protein sequences and their use in predicting protein coding regions in nucleotide sequences. *Proteins.* **(1988)** 4, 99-122.
- [109] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. Kent, Synthesis of proteins by native chemical ligation. *Science.* **(1994)** 266, 776-9.
- [110] P. E. Dawson, S. B. Kent, Synthesis of native proteins by chemical ligation. *Annu Rev Biochem.* **(2000)** 69, 923-60.
- [111] A. Dirksen, P. E. Dawson, Expanding the scope of chemoselective peptide ligations in chemical biology. *Curr Opin Chem Biol.* **(2008)** 12, 760-6.
- [112] S. B. Kent, Total chemical synthesis of proteins. *Chem Soc Rev.* **(2009)** 38, 338-51.
- [113] E. C. Johnson, S. B. Kent, Insights into the mechanism and catalysis of the native chemical ligation reaction. *J Am Chem Soc.* **(2006)** 128, 6640-6.
- [114] J. Xie, P. G. Schultz, Adding amino acids to the genetic repertoire. *Curr Opin Chem Biol.* **(2005)** 9, 548-54.
- [115] C. C. Liu, P. G. Schultz, Adding new chemistries to the genetic code. *Annu Rev Biochem.* **(2010)** 79, 413-44.
- [116] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, Bioorthogonal chemistry: fishing for selectivity in a sea of functionality. *Angew Chem Int Ed Engl.* **(2009)** 48, 6974-98.
- [117] R. Brückner, *Reaktionsmechanismen: organische Reaktionen, Stereochemie, moderne Synthesemethoden*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. **(2003)**.
- [118] A. Dirksen, P. E. Dawson, Rapid oxime and hydrazone ligations with aromatic aldehydes for biomolecular labeling. *Bioconjug Chem.* **(2008)** 19, 2543-8.
- [119] J. Y. Axup, K. M. Bajjuri, M. Ritland, B. M. Hutchins, C. H. Kim, S. A. Kazane, R. Halder, J. S. Forsyth, A. F. Santidrian, K. Stafin, *et al.*, Synthesis of site-specific antibody-drug conjugates using unnatural amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **(2012)** 109, 16101-6.

- [120] S. Milles, S. Tyagi, N. Banterle, C. Koehler, V. VanDelinder, T. Plass, A. P. Neal, E. A. Lemke, Click strategies for single-molecule protein fluorescence. *J Am Chem Soc.* **(2012)** 134, 5187-95.
- [121] E. Saxon, C. R. Bertozzi, Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction. *Science.* **(2000)** 287, 2007-10.
- [122] M. L. Tsao, F. Tian, P. G. Schultz, Selective Staudinger Modification of Proteins Containing p-Azidophenylalanine. *Chembiochem.* **(2005)** 6, 2147-9.
- [123] M. Köhn, R. Breinbauer, The Staudinger ligation-a gift to chemical biology. *Angew Chem Int Ed Engl.* **(2004)** 43, 3106-16.
- [124] M. B. Soellner, B. L. Nilsson, R. T. Raines, Reaction mechanism and kinetics of the traceless Staudinger ligation. *J Am Chem Soc.* **(2006)** 128, 8820-8.
- [125] R. Huisgen, 1,3-Dipolar Cycloadditions. Past and Future. *Angew Chem Int Ed Engl.* **(1963)** 2, 565-98.
- [126] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *J Org Chem.* **(2002)** 67, 3057-64.
- [127] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective "Ligation" of Azides and Terminal Alkynes *Angewandte Chemie.* **(2002)** 114, 2708-11.
- [128] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, From mechanism to mouse: a tale of two bioorthogonal reactions. *Acc Chem Res.* **(2011)** 44, 666-76.
- [129] B. Bonnemain, Superparamagnetic agents in magnetic resonance imaging: physicochemical characteristics and clinical applications. A review. *J Drug Target.* **(1998)** 6, 167-74.
- [130] H. Pilgrim, Superparamagnetische Teilchen mit vergrößerter R1-Relaxivität, Verfahren zur Herstellung und deren Verwendung. *Patent WO/1997/035200* **(1997)**.
- [131] S. Mornet, S. Vasseur, F. Grasset, E. Duguet, Magnetic nanoparticle design for medical diagnosis and therapy. *J Mater Chem.* **(2004)** 14, 2161-75.
- [132] M. Mahmoudi, S. Sant, B. Wang, S. Laurent, T. Sen, Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy. *Adv Drug Deliv Rev.* **(2011)** 63, 24-46.
- [133] A. Mukhopadhyay, N. Joshi, K. Chattopadhyay, G. De, A facile synthesis of PEG-coated magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles and their prevention of the reduction of cytochrome c. *ACS Appl Mater Interfaces.* **(2012)** 4, 142-9.
- [134] L. Josephson, M. F. Kircher, U. Mahmood, Y. Tang, R. Weissleder, Near-infrared fluorescent nanoparticles as combined MR/optical imaging probes. *Bioconjug Chem.* **(2002)** 13, 554-60.
- [135] D. M. Golovko, T. Henning, J. S. Bauer, M. Settles, T. Frenzel, A. Mayerhofer, E. J. Rummeny, H. E. Daldrup-Link, Accelerated stem cell labeling with ferucarbotran and protamine. *Eur Radiol.* **(2010)** 20, 640-8.

- [136] Q. Xu, H. T. Zhang, K. Liu, J. H. Rao, X. M. Liu, L. Wu, B. N. Xu, In vitro and in vivo magnetic resonance tracking of Sinerem-labeled human umbilical mesenchymal stromal cell-derived Schwann cells. *Cell Mol Neurobiol.* **(2011)** 31, 365-75.
- [137] G. M. van Buul, E. Farrell, N. Kops, S. T. van Tiel, P. K. Bos, H. Weinans, G. P. Krestin, G. J. van Osch, M. R. Bernsen, Ferumoxides-protamine sulfate is more effective than ferucarbotran for cell labeling: implications for clinically applicable cell tracking using MRI. *Contrast Media Mol Imaging.* **(2009)** 4, 230-6.
- [138] H. Kojima, Y. Mukai, M. Yoshikawa, K. Kamei, T. Yoshikawa, M. Morita, T. Inubushi, T. A. Yamamoto, Y. Yoshioka, N. Okada, *et al.*, Simple PEG conjugation of SPIO via an Au-S bond improves its tumor targeting potency as a novel MR tumor imaging agent. *Bioconjug Chem.* **(2010)** 21, 1026-31.
- [139] M. E. Aubin-Tam, K. Hamad-Schifferli, Structure and function of nanoparticle-protein conjugates. *Biomed Mater.* **(2008)** 3, 034001.
- [140] E. D. Smolensky, H. Y. Park, T. S. Berquó, V. C. Pierre, Surface functionalization of magnetic iron oxide nanoparticles for MRI applications - effect of anchoring group and ligand exchange protocol. *Contrast Media Mol Imaging.* **(2011)** 6, 189-99.
- [141] B. Samanta, H. Yan, N. O. Fischer, J. Shi, D. J. Jerry, V. M. Rotello, Protein-passivated Fe(3)O(4) nanoparticles: low toxicity and rapid heating for thermal therapy. *J Mater Chem.* **(2008)** 18, 1204-8.
- [142] J. R. McCarthy, R. Weissleder, Multifunctional magnetic nanoparticles for targeted imaging and therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* **(2008)** 60, 1241-51.
- [143] J. Choi, J. I. Lee, Y. B. Lee, J. H. Hong, I. S. Kim, Y. K. Park, N. H. Hur, Immobilization of biomolecules on biotinylated magnetic ferrite nanoparticles. *Chem Phys Lett.* **(2006)** 428, 125-9.
- [144] R. Narain, M. Gonzales, A. S. Hoffman, P. S. Stayton, K. M. Krishnan, Synthesis of monodisperse biotinylated p(NIPAAm)-coated iron oxide magnetic nanoparticles and their bioconjugation to streptavidin. *Langmuir.* **(2007)** 23, 6299-304.
- [145] M. Hodenius, T. Hieronymus, M. Zenke, C. Becker, L. Elling, J. Bornemann, J. E. Wong, W. Richtering, U. Himmelreich, M. De Cuyper, Magnetically triggered clustering of biotinylated iron oxide nanoparticles in the presence of streptavidinylated enzymes. *Nanotechnology.* **(2012)** 23, 355707.
- [146] M. Taupitz, J. Schnorr, C. Abramjuk, S. Wagner, H. Pilgrim, H. Hünigen, B. Hamm, New generation of monomer-stabilized very small superparamagnetic iron oxide particles (VSOP) as contrast medium for MR angiography: Preclinical results in rats and rabbits. *J Magn Reson Imaging.* **(2000)** 12, 905-11.
- [147] T. H. Wang, W. C. Lee, Immobilization of proteins on magnetic nanoparticles. *Biotechnology and Bioprocess Engineering.* **(2003)** 8, 263-7.
- [148] K. Wagner, A. Kautz, M. Röder, M. Schwalbe, K. Pachmann, J. H. Clement, M. Schnabelrauch, Synthesis of oligonucleotide-functionalized magnetic nanoparticles and study on their in vitro cell uptake. *Applied Organometallic Chemistry.* **(2004)** 18, 514-9.

- [149] L. Yang, X. H. Peng, Y. A. Wang, X. Wang, Z. Cao, C. Ni, P. Karna, X. Zhang, W. C. Wood, X. Gao, *et al.*, Receptor-targeted nanoparticles for in vivo imaging of breast cancer. *Clin Cancer Res.* **(2009)** 15, 4722-32.
- [150] A. Hvass, B. Skelbaek-Pedersen, Determination of protamine peptides in insulin drug products using reversed phase high performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal.* **(2005)** 37, 551-7.
- [151] F. Reynolds, R. Weissleder, L. Josephson, Protamine as an efficient membrane-translocating peptide. *Bioconjug Chem.* **(2005)** 16, 1240-5.
- [152] M. J. Pittet, F. K. Swirski, F. Reynolds, L. Josephson, R. Weissleder, Labeling of immune cells for in vivo imaging using magnetofluorescent nanoparticles. *Nat Protoc.* **(2006)** 1, 73-9.
- [153] I. Kratzer, K. Wernig, U. Panzenboeck, E. Bernhart, H. Reicher, R. Wronski, M. Windisch, A. Hammer, E. Malle, A. Zimmer, *et al.*, Apolipoprotein A-I coating of protamine-oligonucleotide nanoparticles increases particle uptake and transcytosis in an in vitro model of the blood-brain barrier. *J Control Release.* **(2007)** 117, 301-11.
- [154] J. P. Mira, T. Dubois, J. P. Oudinet, S. Lukowski, F. Russo-Marie, B. Geny, Inhibition of cytosolic phospholipase A2 by annexin V in differentiated permeabilized HL-60 cells. Evidence of crucial importance of domain I type II Ca²⁺-binding site in the mechanism of inhibition. *J Biol Chem.* **(1997)** 272, 10474-82.
- [155] J. A. Hoffmann, R. E. Chance, M. G. Johnson, Purification and analysis of the major components of chum salmon protamine contained in insulin formulations using high-performance liquid chromatography. *Protein Expr Purif.* **(1990)** 1, 127-33.
- [156] A. J. Lomant, G. Fairbanks, Chemical probes of extended biological structures: synthesis and properties of the cleavable protein cross-linking reagent [35S]dithio-bis(succinimidyl propionate). *J Mol Biol.* **(1976)** 104, 243-61.
- [157] J. Carlsson, H. Drevin, R. Axén, Protein thiolation and reversible protein-protein conjugation. N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate, a new heterobifunctional reagent. *Biochem J.* **(1978)** 173, 723-37.
- [158] J. V. Staros, R. W. Wright, D. M. Swingle, Enhancement by N-hydroxysulfosuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions. *Anal Biochem.* **(1986)** 156, 220-2.
- [159] Z. Grabarek, J. Gergely, Zero-length crosslinking procedure with the use of active esters. *Anal Biochem.* **(1990)** 185, 131-5.
- [160] J. Schubert, A. Lindenbaum, Stability of Alkaline Earth-Organic Acid Complexes Measured by Ion Exchange. *J Am Chem Soc.* **(1952)** 74, 3529-32.
- [161] E. W. Moore, Ionized calcium in normal serum, ultrafiltrates, and whole blood determined by ion-exchange electrodes. *J Clin Invest.* **(1970)** 49, 318-34.
- [162] J. V. Staros, Membrane-impermeant crosslinking reagents: probes of the structure and dynamics of membrane proteins. *Acc Chem Res.* **(1988)** 21, 435-41.
- [163] P. Cuatrecasas, I. Parikh, Adsorbents for affinity chromatography. Use of N-hydroxysuccinimide esters of agarose. *Biochemistry.* **(1972)** 11, 2291-9.

- [164] M. Bauwens, M. De Saint-Hubert, E. Devos, N. Deckers, C. Reutelingsperger, L. Mortelmans, U. Himmelreich, F. M. Mottaghy, A. Verbruggen, Site-specific ^{68}Ga -labeled Annexin A5 as a PET imaging agent for apoptosis. *Nucl Med Biol.* **(2011)** 38, 381-92.
- [165] T. Funakoshi, L. E. Hendrickson, B. A. McMullen, K. Fujikawa, Primary structure of human placental anticoagulant protein. *Biochemistry.* **(1987)** 26, 8087-92.
- [166] R. Huber, R. Berendes, A. Burger, M. Schneider, A. Karshikov, H. Luecke, J. Römisch, E. Paques, Crystal and molecular structure of human annexin V after refinement. Implications for structure, membrane binding and ion channel formation of the annexin family of proteins. *J Mol Biol.* **(1992)** 223, 683-704.
- [167] M. A. Swairjo, N. O. Concha, M. A. Kaetzel, J. R. Dedman, B. A. Seaton, $\text{Ca}(2+)$ -bridging mechanism and phospholipid head group recognition in the membrane-binding protein annexin V. *Nat Struct Biol.* **(1995)** 2, 968-74.
- [168] P. Caravan, Protein-Targeted Gadolinium-Based Magnetic Resonance Imaging (MRI) Contrast Agents: Design and Mechanism of Action. *Acc Chem Res.* **(2009)** 42, 851-62.
- [169] D. A. Yablonskiy, E. M. Haacke, Theory of NMR signal behavior in magnetically inhomogeneous tissues: The static dephasing regime. *Magn Reson Med.* **(1994)** 32, 749-63.
- [170] J. J. Yang, J. Yang, L. Wei, O. Zurkiya, W. Yang, S. Li, J. Zou, Y. Zhou, A. L. W. Manniccia, H. Mao, *et al.*, Rational Design of Protein-based MRI Contrast Agents. *J Am Chem Soc.* **(2008)** 130, 9260.
- [171] H. Duan, M. Kuang, X. Wang, Y. A. Wang, H. Mao, S. Nie, Reexamining the Effects of Particle Size and Surface Chemistry on the Magnetic Properties of Iron Oxide Nanocrystals: New Insights into Spin Disorder and Proton Relaxivity. *J Phys Chem C.* **(2008)** 112, 8127-31.
- [172] I. Koh, R. Hong, R. Weissleder, L. Josephson, Nanoparticle-target interactions parallel antibody-protein interactions. *Anal Chem.* **(2009)** 81, 3618-22.
- [173] D. E. Sosnovik, E. Garanger, E. Aikawa, M. Nahrendorf, J. L. Figuiredo, G. Dai, F. Reynolds, A. Rosenzweig, R. Weissleder, L. Josephson, Molecular MRI of Cardiomycocyte Apoptosis With Simultaneous Delayed-Enhancement MRI Distinguishes Apoptotic and Necrotic Myocytes In Vivo: Potential for Midmyocardial Salvage in Acute Ischemia. *Circ Cardiovasc Imaging.* **(2009)** 2, 460-7.
- [174] J. H. Lin, A. Y. Lu, Role of pharmacokinetics and metabolism in drug discovery and development. *Pharmacol Rev.* **(1997)** 49, 403-49.
- [175] J. O. Naim, R. J. Lanzafame, J. R. Blackman, J. R. Hinshaw, The in vitro quenching effects of iron and iodine on fluorescein fluorescence. *J Surg Res.* **(1986)** 40, 225-8.
- [176] S. S. Tan, S. J. Kim, E. T. Kool, Differentiating between fluorescence-quenching metal ions with polyfluorophore sensors built on a DNA backbone. *J Am Chem Soc.* **(2011)** 133, 2664-71.
- [177] L. Stryer, Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Annu Rev Biochem.* **(1978)** 47, 819-46.

-
- [178] J. Koolmann, K. H. Röhm, J. Wirth, *Taschenatlas der Biochemie*. Thieme, Stuttgart. (2003).
- [179] N. Liu, K. Deguchi, J. Shang, X. Zhang, F. Tian, T. Yamashita, Y. Ohta, Y. Ikeda, T. Matsuura, K. Abe, In vivo optical imaging of early-stage apoptosis in mouse brain after transient cerebral ischemia. *J Neurosci Res.* (2010) 88, 3488-97.
- [180] E. A. Schellenberger, F. Reynolds, R. Weissleder, L. Josephson, Surface-functionalized nanoparticle library yields probes for apoptotic cells. *Chembiochem.* (2004) 5, 275-9.
- [181] S. R. Gallagher, One-dimensional electrophoresis using nondenaturing conditions. *Curr Protoc Cell Biol.* (2001) Chapter 6, Unit 6.5.
- [182] K. Cammann, *Instrumentelle Analytische Chemie: Verfahren, Anwendungen und Qualitätssicherung*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. (2010).
- [183] P. K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, D. C. Klenk, Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* (1985) 150, 76-85.
- [184] Cohn, A. Corey, Pak, Aimee, Strongin, Daniel, Schoonen, A. Martin, Quantifying hydrogen peroxide in iron-containing solutions using leuco crystal violet. *Geochemical Transactions.* (2005) 6, 47.
- [185] F. Reynolds, T. O'loughlin, R. Weissleder, L. Josephson, Method of determining nanoparticle core weight. *Anal Chem.* (2005) 77, 814-7.
- [186] T. Shen, R. Weissleder, M. Papisov, A. Bogdanov, T. J. Brady, Monocrystalline iron oxide nanocompounds (MION): physicochemical properties. *Magn Reson Med.* (1993) 29, 599-604.
- [187] D. E. Sosnovik, E. Garanger, E. Aikawa, M. Nahrendorf, J. L. Figuiro, G. Dai, F. Reynolds, A. Rosenzweig, R. Weissleder, L. Josephson, Molecular MRI of cardiomyocyte apoptosis with simultaneous delayed-enhancement MRI distinguishes apoptotic and necrotic myocytes in vivo: potential for midmyocardial salvage in acute ischemia. *Circ Cardiovasc Imaging.* (2009) 2, 460-7.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Alanin
Ala	Alanin
AnxA5	Cys-Annexin A5
Apaf-1	<i>apoptotic protease activating factor 1</i>
APS	Ammoniumpersulfat
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
BCA	<i>bicinchoninic acid</i> , Bicinchoninsäure
ber	berechnet
Bid	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
BMH	Bismaleimidohexan
BP	Bindungspuffer
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderalbumin
C	Cystein
CHCA	α -Cyano-4-Hydroxyzimtsäure
CLIO	<i>cross-linked iron oxides</i> , quervernetzte Eisenoxide
CT	Computertomographie
CuAAC	Cu(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition
Cys	Cystein
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DPDPB	1,4-Di-(3'-[2'-pyridyldithio]-propionamido)butan

DSS	Disuccinimidylsuberat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> , Ethylendiamintetratessigsäure
Em	Emissionswellenlänge
Ex	Extinktionswellenlänge
FA	<i>flip angle</i> , Flip-Winkel
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fluo	Fluorescein
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
G	Glycin
gef	gefunden
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HF-Radioimpuls	Hochfrequenz-Radioimpuls
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> , Hochleistungsflüssigchromatographie
I	Isoleucin
IR	infrarot
K	Lysin
Lys	Lysin
M1234	Cys-M1234 (inaktive AnxA5-Variante)
MACS	<i>magnetic cell separation</i> , magnetische Zellseparation
Mal	Maleimid
MALDI/TOF	<i>matrix assisted laser desorption and ionization / time of flight</i> , Matrix-unterstützte Laser-Desorption und-Ionisation / Flugzeit
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure

MMP	Matrixmetalloproteinase
MPBH	4-(4- <i>N</i> -Maleimidophenyl)butansäurehydrazidhydrochlorid
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Massenspektrometrie
NCL	<i>native chemical ligation</i>
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NIR	nahinfrarot
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> , Kernspinresonanz
P	Prolin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PEG	Polyethylenglykol
PET	Positronenemissionstomographie
PMT	<i>photomultiplier</i> , Photoelektronenvervielfacher
PSOP	Protease-spezifische Eisenoxidpartikel
Q	Glutamin
R	Arginin
R1	T1-Relaxivität
R2	T2-Relaxivität
Ret	Retention
RGD	Arginin-Glycin-Asparaginsäure
ROI	<i>region of interest</i> , Region von Interesse
RPMI-Medium	<i>Roswell-Park-Memorial-Institute-Medium</i>
RT	Raumtemperatur
SATA	<i>N</i> -Succinimidyl-S-acetylthioacetat
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
SPDP	<i>N</i> -Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionat
SPECT	<i>single-photon emission computed tomography</i> , Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie
Sulfo-NHS	<i>N</i> -Hydroxysulfosuccinimid
Sulfo-SMCC	Sulfosuccinimidyl-4-(<i>N</i> -maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat

T	Threonin
T1	longitudinale Relaxationszeit
T2	transversale Relaxationszeit
T2*	transversale Relaxationszeit in Kombination mit der Dephasierung durch Feldinhomogenitäten
TE	Echozeit
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
TFA	<i>trifluoroacetic acid</i> , Trifluoressigsäure
TGF- β	<i>transforming growth factor-β</i>
TIMP	<i>tissue inhibitor of metallo-proteinases</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TR	Repetitionszeit
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	ultraviolett
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
Vis	<i>visible</i> , sichtbar
VSOP	<i>very small iron oxide particles</i> , sehr kleine Eisenoxidpartikel

ANHANG

AnxA5-beschichtete VSOP

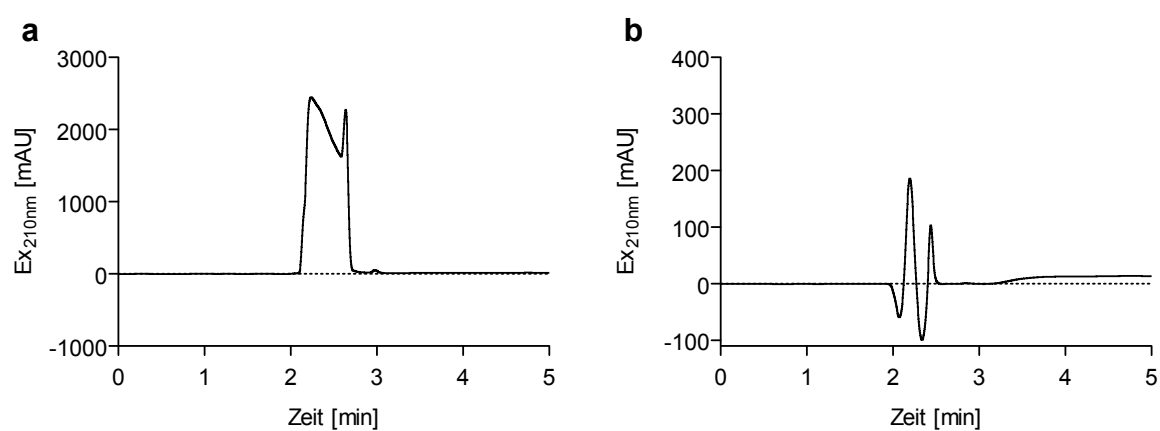


Abbildung A.1: HPLC-Chromatogramme des Kopplungsreagenz SPDP (a) und des gereinigten Reaktionsansatzes des aktivierten Peptids SPDP-P1-SPDP (K1.1a) (b).

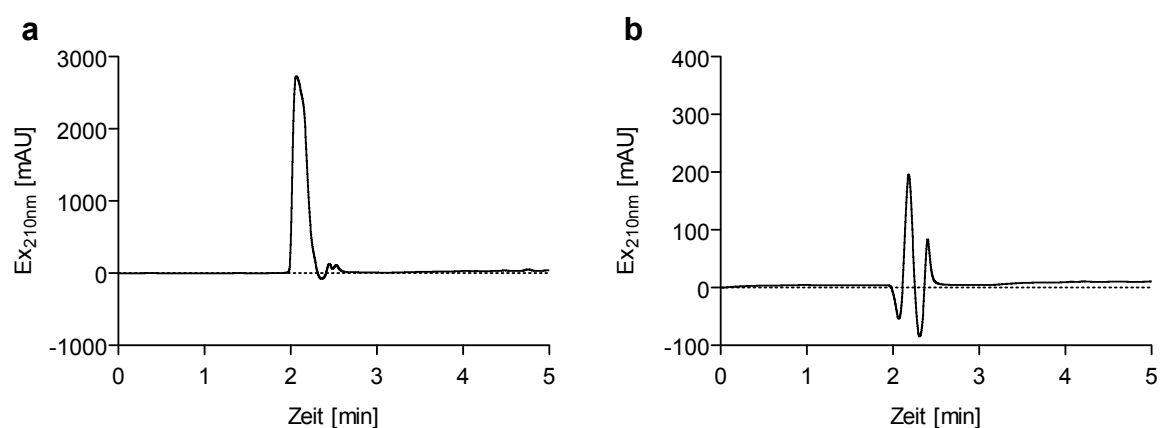


Abbildung A.2: HPLC-Chromatogramme des Kopplungsreagenz Sulfo-SMCC (a) und des gereinigten Reaktionsansatzes des aktivierten Peptids SMCC-P1-SMCC (K1.3a) (b).

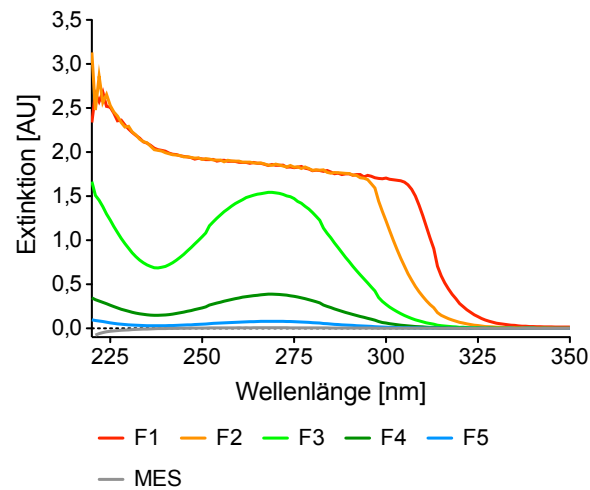


Abbildung A.3: Absorptionsspektren der gesammelten Filtrate (F) aus der Reinigung aktivierter VSOP vor der Umsetzung mit AnxA5 bzw. M1234.

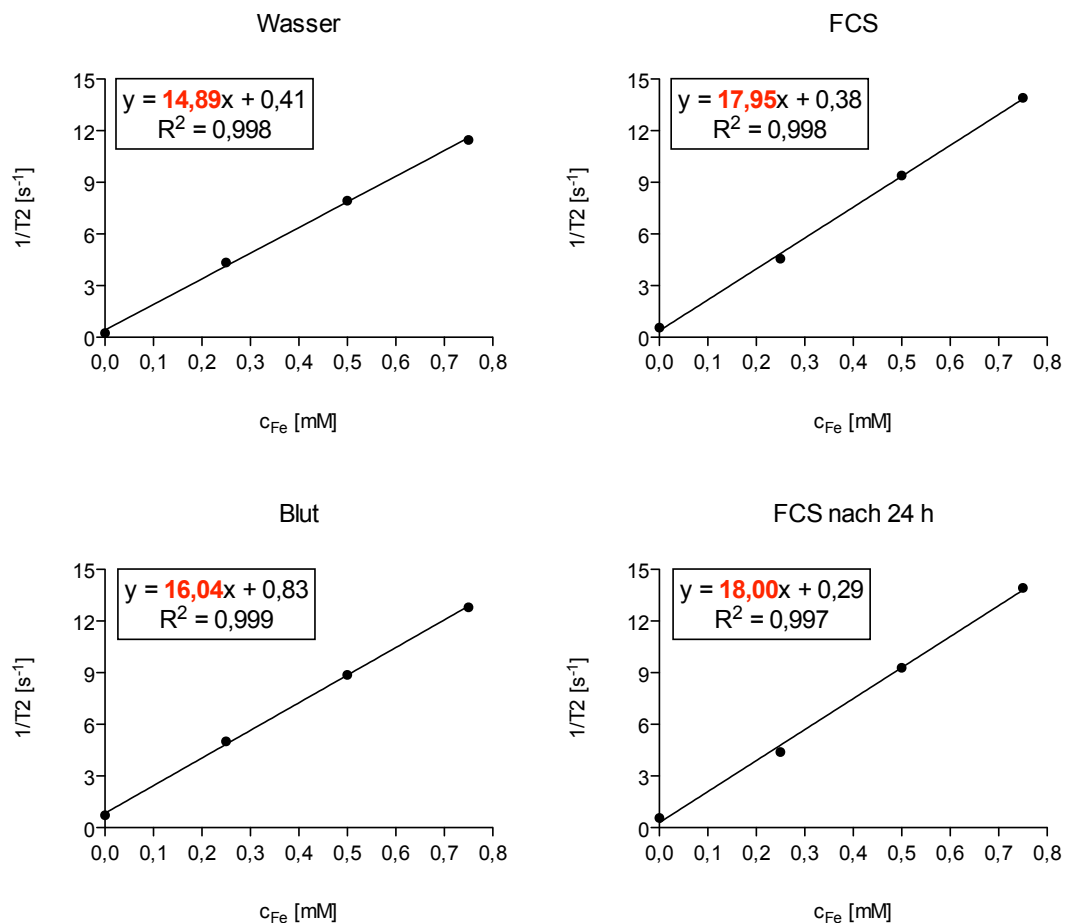


Abbildung A.4: T1-Relaxivitätsmessung der AnxA5-VSOP in Wasser, Blut und FCS.

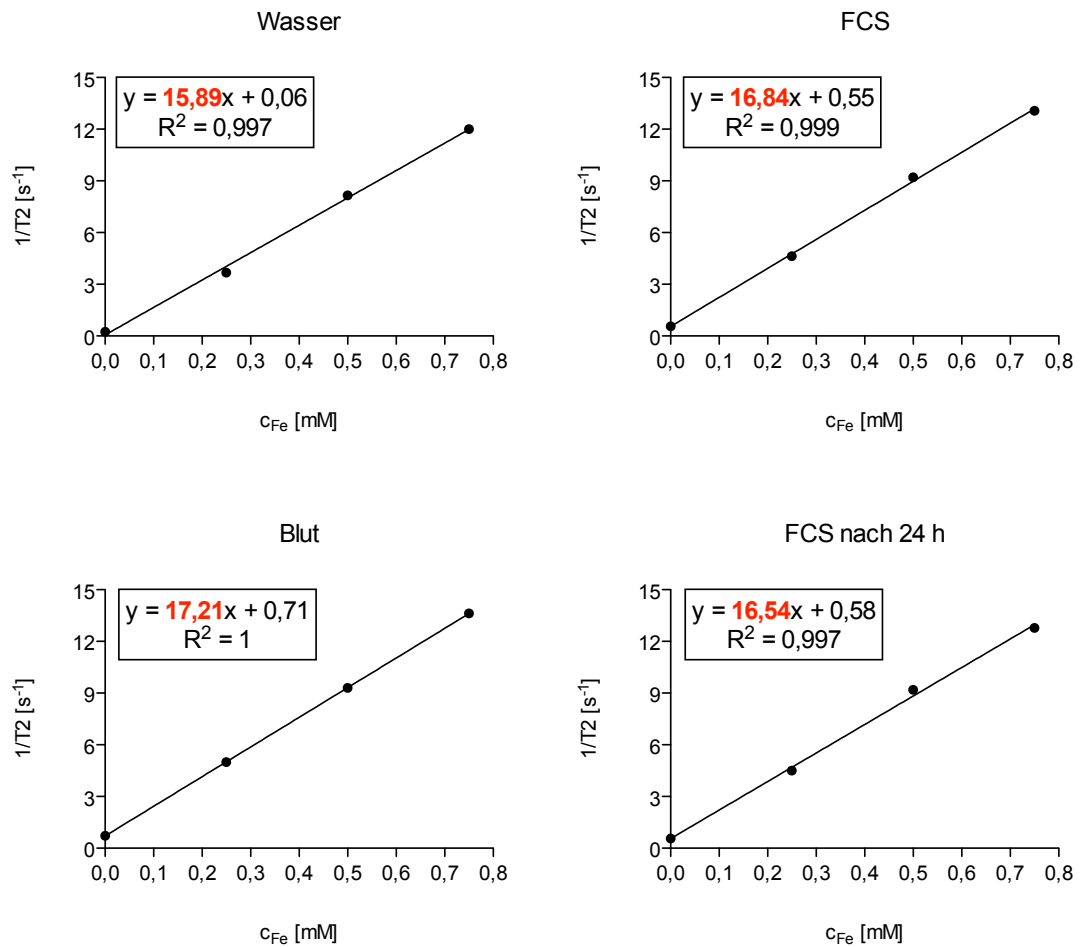


Abbildung A.5: T1-Relaxivitätsmessung der M1234-VSOP in Wasser, Blut und FCS.

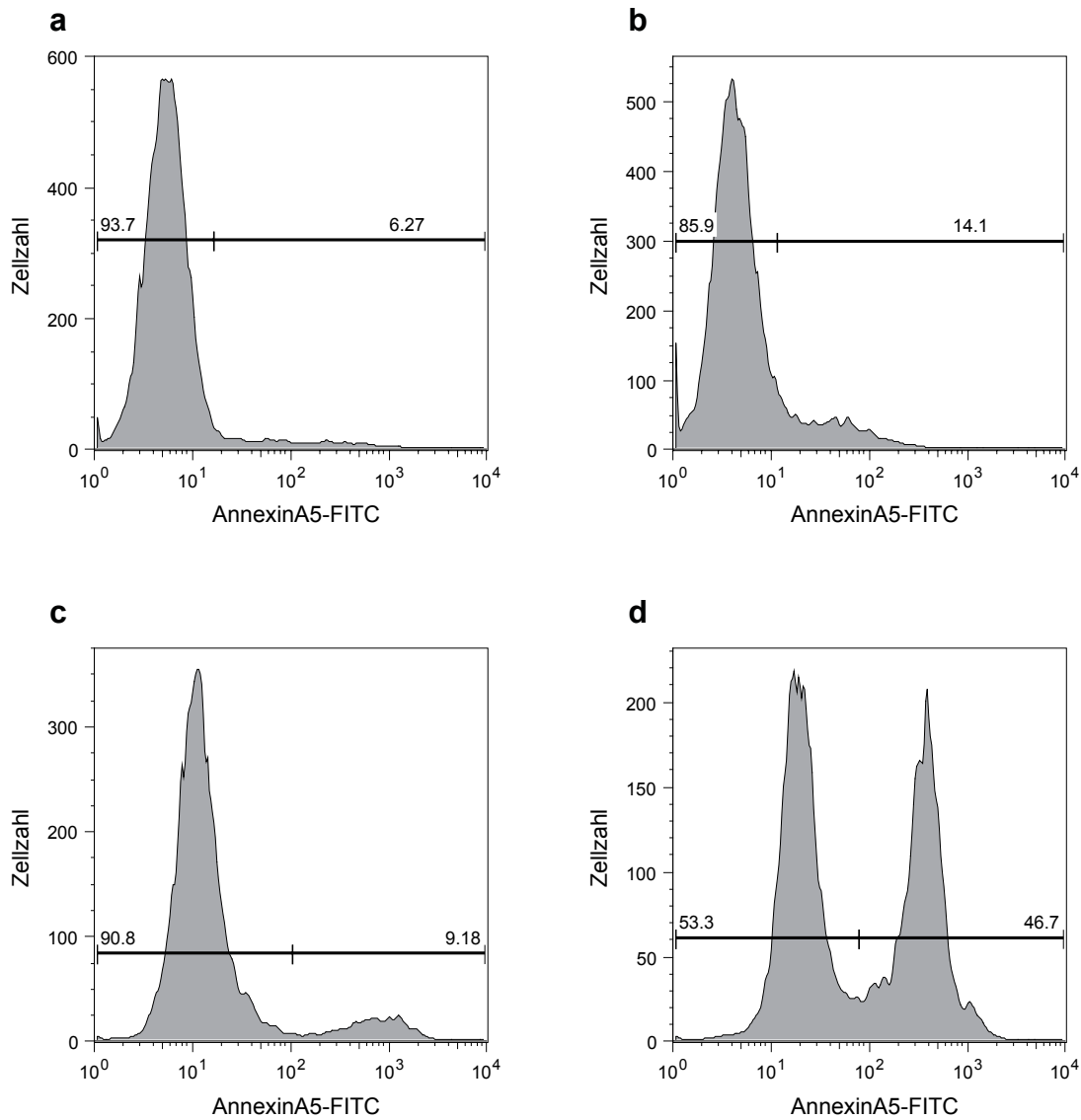


Abbildung A.6: Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen von unbehandelten Jurkat-T-Zellen (a, c) und Camptothecin-behandelten Jurkat-T-Zellen (b, d) zweier unabhängiger Versuche (a+b bzw. c+d) mittels Durchflusszytometrie.

PSOP

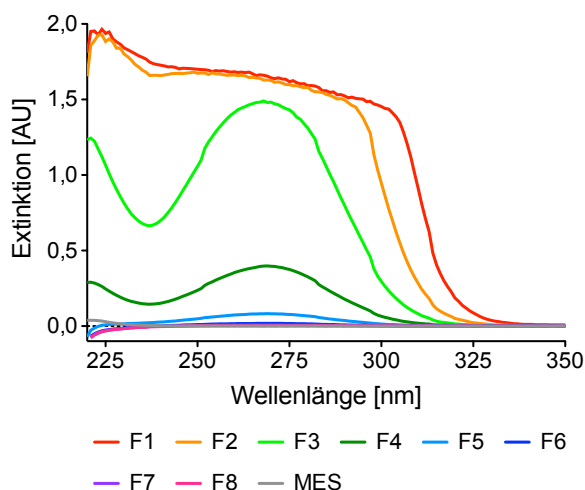


Abbildung A.7: Absorptionsspektren der gesammelten Filtrate (F) aus der Reinigung aktivierter VSOP vor der Umsetzung mit 20 MMP(Lys)-PEG5000 (K5) bzw. 20 MMP(LysArgGly)-PEG5000 (K6).

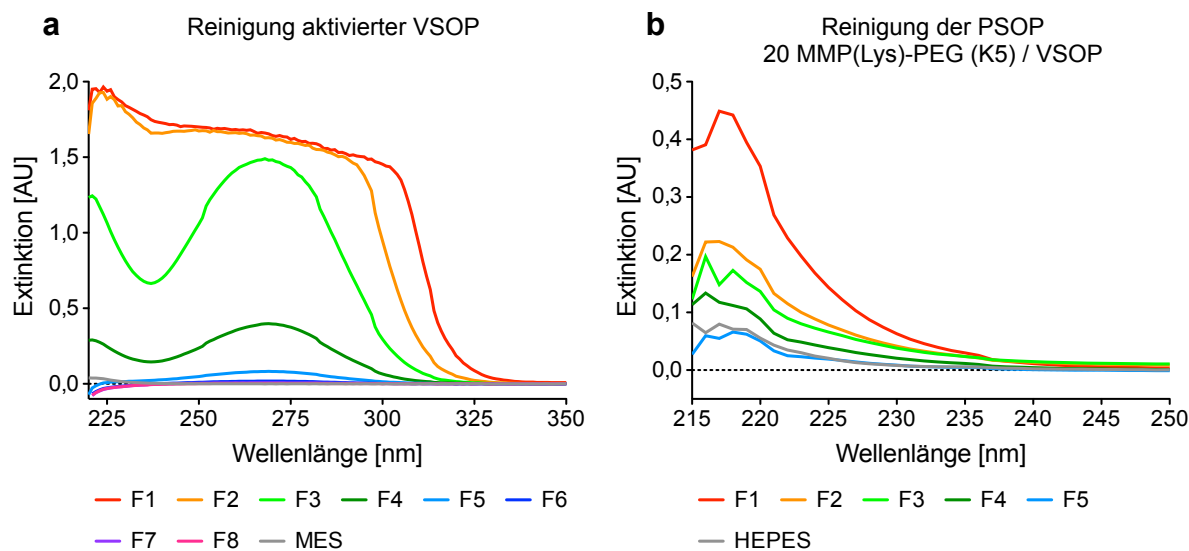


Abbildung A.8: Absorptionsspektren der gesammelten Filtrate (F) aus der Reinigung aktivierter VSOP (a) vor der Umsetzung mit 20 MMP(Lys)-PEG5000 (K5) sowie der daraus erhaltenen PSOP (b).

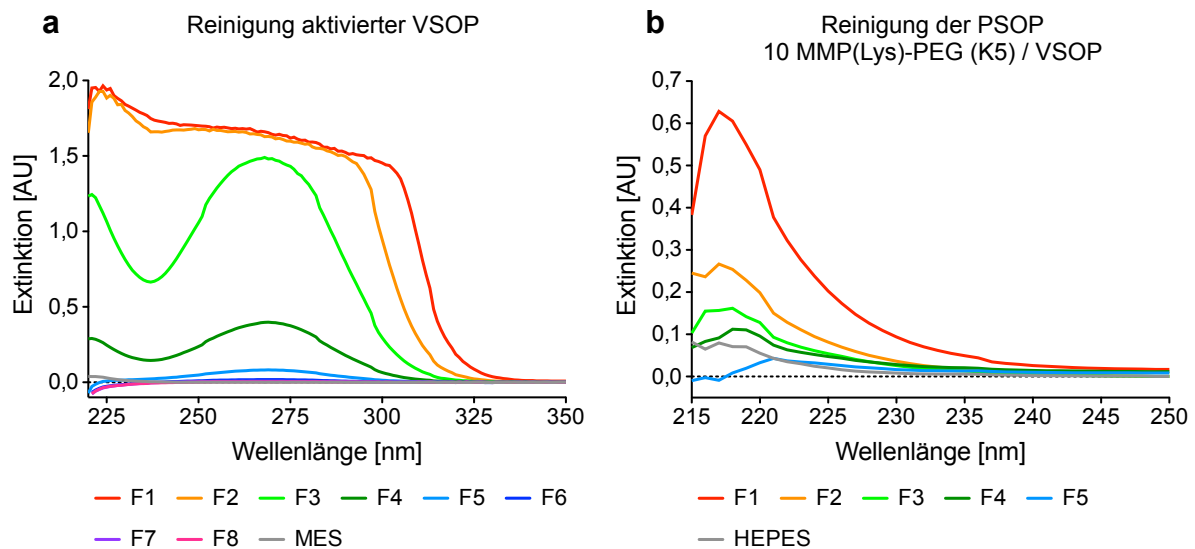


Abbildung A.9: Absorptionsspektren der gesammelten Filtrate (F) aus der Reinigung aktivierter VSOP (a) vor der Umsetzung mit 10 MMP(Lys)-PEG5000 (K5) sowie der daraus erhaltenen PSOP (b).

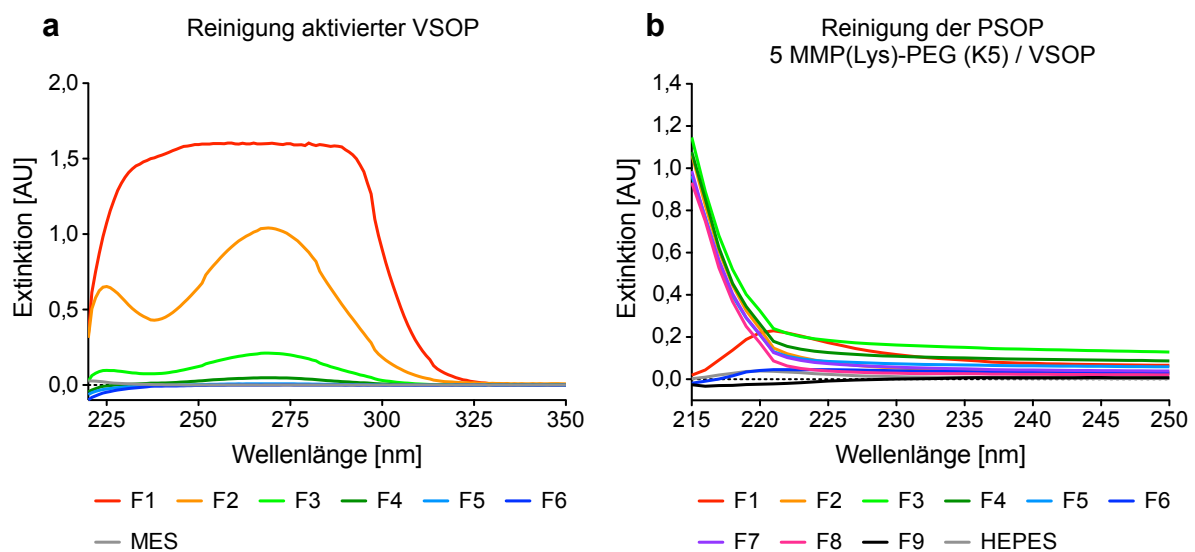


Abbildung A.10: Absorptionsspektren der gesammelten Filtrate (F) aus der Reinigung aktivierter VSOP (a) vor der Umsetzung mit 5 MMP(Lys)-PEG5000 (K5) sowie der daraus erhaltenen PSOP (b).

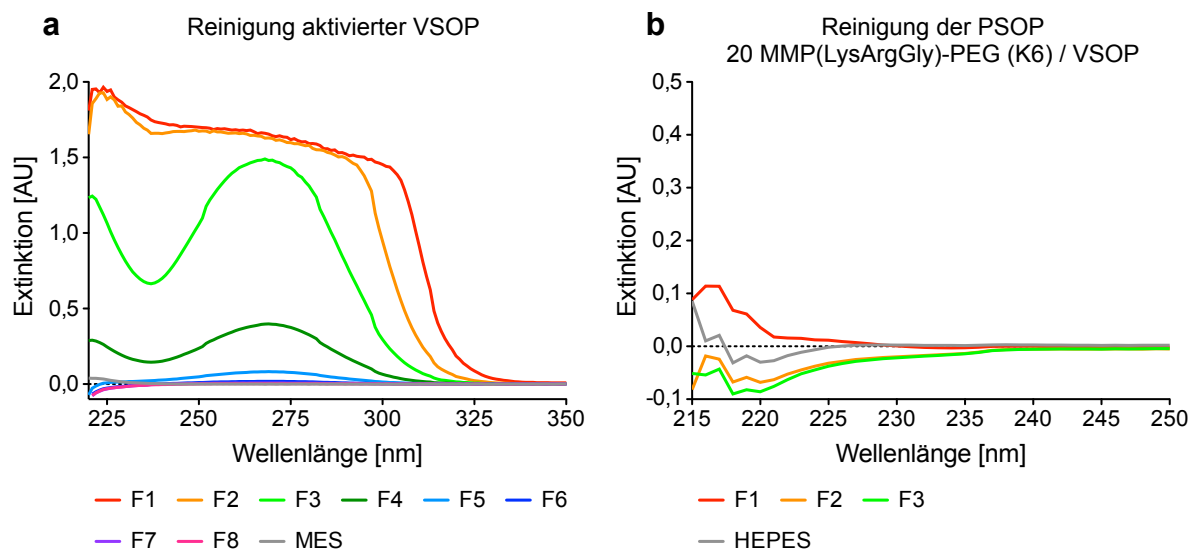


Abbildung A.11: Absorptionsspektren der gesammelten Filtrate (F) aus der Reinigung aktivierter VSOP (a) vor der Umsetzung mit 20 MMP(LysArgGly)-PEG5000 (K6) sowie der daraus erhaltenen PSOP (b).

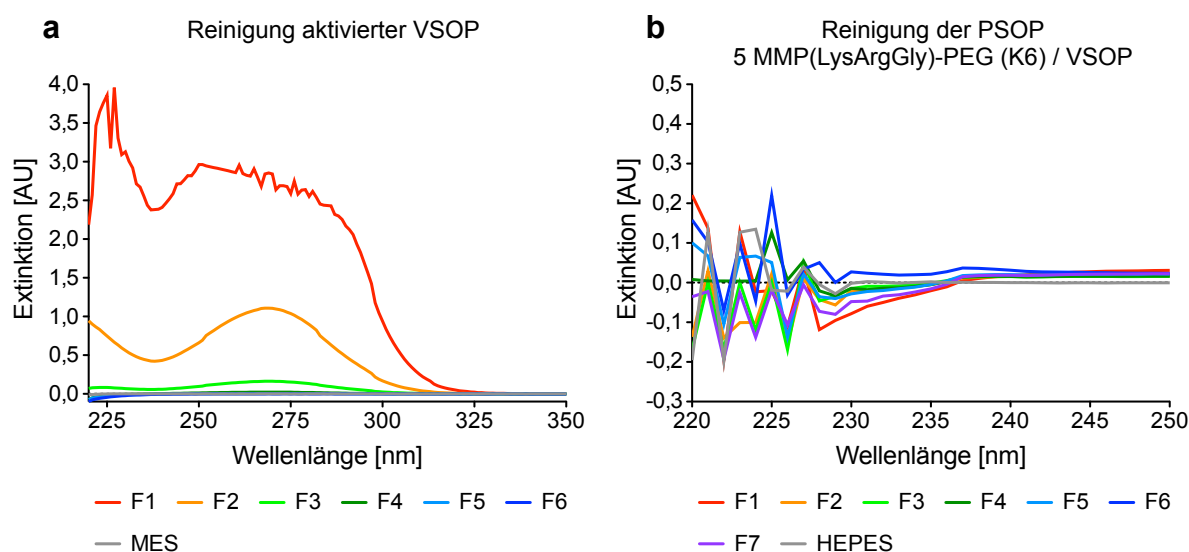


Abbildung A.12: Absorptionsspektren der gesammelten Filtrate (F) aus der Reinigung aktivierter VSOP (a) vor der Umsetzung mit 5 MMP(LysArgGly)-PEG5000 (K6) sowie der daraus erhaltenen PSOP (b).

PUBLIKATIONSLISTE

L. Figge, F. Appler, H. H. Chen, D. E. Sosnovik, J. Schnorr, O. Seitz, M. Taupitz, B. Hamm, E. Schellenberger, Direct coupling of annexin A5 to VSOP yields small, protein-covered nanoparticles for MR imaging of apoptosis. *Contrast Media Mol Imaging*. **(2014)** 9, 291-9.

A. Haeckel, F. Appler, **L. Figge**, H. Kratz, M. Lucas, R. Michel, J. Schnorr, M. Zille, B. Hamm, E. Schellenberger, XTEN-Annexin A5: XTEN allows complete expression of long- circulating protein-based imaging probes as recombinant alternative to PEGylation. *J Nucl Med*. **(2014)** 55, 508-14.

H. Kratz, A. Haeckel, R. Michel, **L. Schönzart**, U. Hanisch, B. Hamm, E. Schellenberger, Straightforward thiol-mediated protein labelling with DTPA: Synthesis of a highly active ¹¹¹In-annexin A5-DTPA tracer. *EJNMMI Res*. **(2012)** 2, 17.

A. Haeckel, **L. Schoenzart**, F. Appler, J. Schnorr, M. Taupitz, B. Hamm, E. Schellenberger, Combined in situ zymography, immunofluorescence, and staining of iron oxide particles in paraffin-embedded, zinc-fixed tissue sections. *Mol Imaging*. **(2012)** 11, 383-8.

J. Michael, **L. Schönzart**, I. Israel, R. Beutner, D. Scharnweber, H. Worch, U. Hempel, B. Schwenzer, Oligonucleotide-RGD peptide conjugates for surface modification of titanium implants and improvement of osteoblast adhesion. *Bioconjug Chem*. **(2009)** 20, 710-8.